LUDWIG PINCUSSEN

MIKROMETHODIK

SECHSTE, VERMEHRTE UND
VERBESSERTE AUFLAGE



FRANZ DEUTICKE / LEIPZIG · WIEN



MIKROMETHODIK

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER HARN-, BLUT- UND ORGANBESTANDTEILE IN KLEINEN MENGEN FÜR KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE ZWECKE

von

LUDWIG PINCUSSEN

Sechste, vermehrte und verbesserte Auflage

Mit 31 Abbildungen

LEIPZIG und WIEN
FRANZ DEUTICKE
1937

Verlags-Nr. 3739.

Druck von Paul Gerin, Wien

Vorwort.

Wie bei den früheren Auflagen war ich bemüht, neue erprobte Methoden einzufügen und alte, die mir nicht mehr zweckentsprechend erschienen, auszumerzen. Diesem Grundsatz zufolge mußten auch einige von Bang angegebene Verfahren, die sich als zu schwierig in der Ausführung erwiesen hatten, fortbleiben, während z. B. seine klassische Methode der Blutzuckerbestimmung geblieben ist. Die Bestimmung des Natriums und der Glukose im Harn sind durch andere Verfahren ersetzt worden, die volumetrische Bestimmung des Harnstoffes ist als entbehrlich fortgeblieben. Neu hinzugekommen sind die Bestimmung des Stickstoffes durch direkte Nesslerisation, die Bestimmung des Kohlenstoffes, für die Blutuntersuchung die Bestimmung der Sulfate, des Ammoniaks, der Fraktionen des Bluteiweißes, des Glutathions und des Indikans. Der kolorimetrischen Milchsäure-Bestimmung wurde eine titrimetrische Methode beigefügt. Ich hoffe, daß diese Änderungen den Beifall der Freunde des Büchleins finden werden.

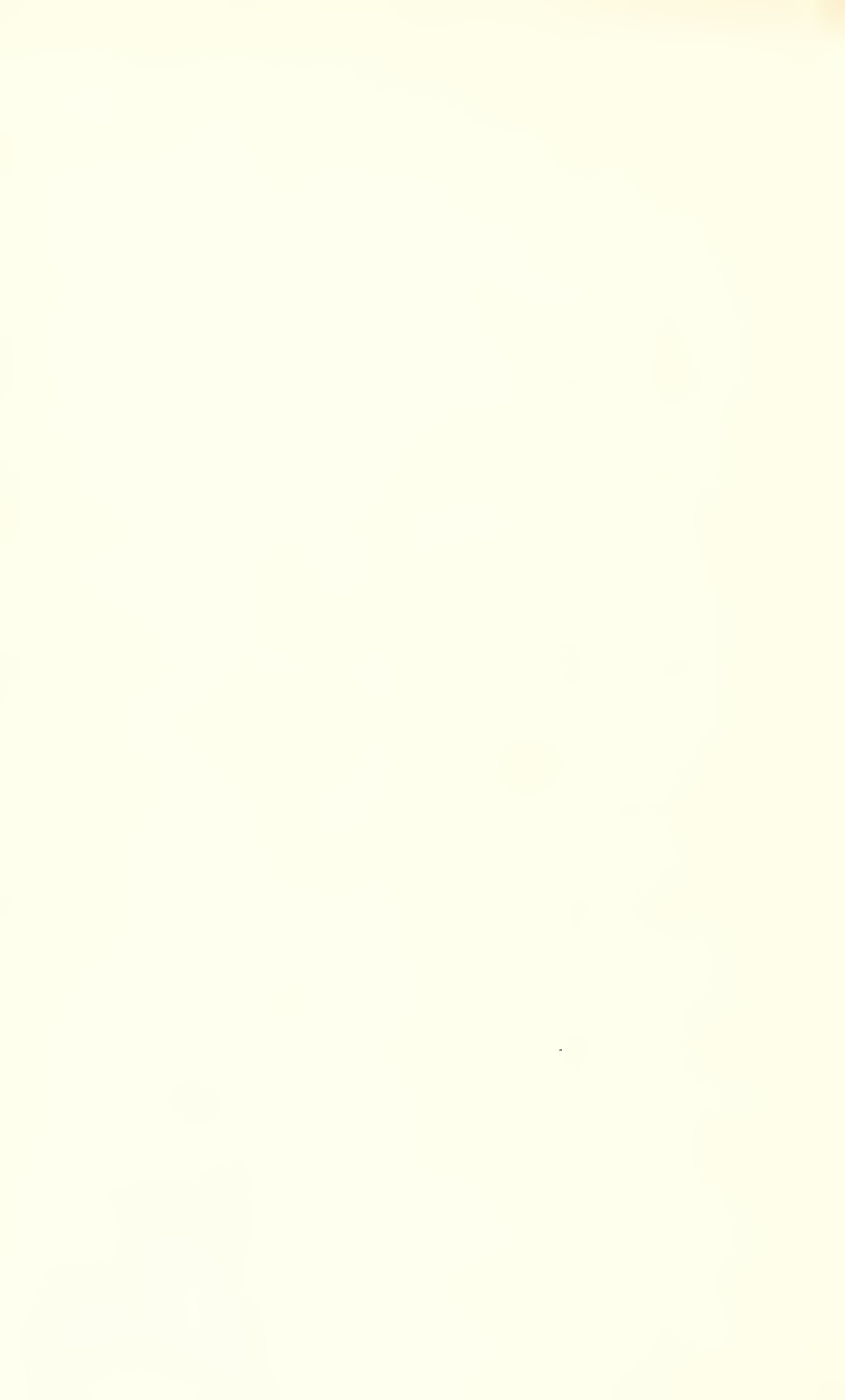
Mit dieser Auflage ist die Mikromethodik an den Verlag von Franz Deuticke übergegangen. Die zum Teil unscharfen Abbildungen wurden durchweg durch neue ersetzt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Verlagshause für seine verständnisvolle Mitarbeit zu danken.

Chicago, November 1936.

LUDWIG PINCUSSEN.



Inhalt.



Allgemeines.

Grundregeln.

Für mikrochemische Arbeiten gelten im allgemeinen dieselben Regeln wie für chemisches Arbeiten überhaupt. Bei den geringen Substanzmengen, welche für die Ausführung quantitativer Mikroanalysen angewandt werden, kommt es ganz besonders auf exaktes Arbeiten an. Es ist klar, daß bei Analysen mit kleinen Mengen die Fehlerquellen eine ganz andere Rolle spielen müssen als bei Verwendung größerer Quantitäten. Diese Fehlerquellen nach Möglichkeit zu reduzieren, ist eine Hauptaufgabe des mikrochemischen Arbeiters.

Fehler können, ohne daß den Arbeiter eine Schuld dabei trifft, schon verursacht sein durch ungeeignete Apparatur sowie durch die angewandten Reagentien. Hier möge vor allem darauf aufmerksam gemacht sein, daß gewöhnliches Natronglas nur für kalte Flüssigkeiten benutzt werden darf — man kann ohne Bedenken Meßgefäße u. dgl. aus gewöhnlichem Glase benutzen —, daß zum Kochen aber ausschließlich Jenaer Glas oder Pyrex-Glas angewendet wird. Mitunter kann Kork, öfter Kautschuk, besonders alter, sowohl bei Anwendung als Stopfen als auch als Schlauch zu Fehlern Anlaß geben. Reinere Resultate erhält man sicher bei Anwendung nur gläserner Verbindungen und Apparaturen. Bei Vereinigung zweier Rohre durch Kautschukschlauch achte man auf ein Zusammenstoßen dieser: Glas an Glas. Zum Filtrieren werden vielfach mit Vorteil statt der gewöhnlichen Filter die Jenaer Filtergeräte (Schott & Gen.) mit eingeschmolzener Filterplatte verwendet, die trotz des ziemlich hohen Preises infolge ihrer bequemen Handhabung, guten und exakten Arbeitens und langer Verwendbarkeit mannigfache Vorteile bieten. Von Reagentien sind stets die allerreinsten

erhältlichen zu wählen. Auch diese reinsten Reagentien enthalten häufig Beimengungen, die geeignet sind, die erhaltenen Resultate zu fälschen. So gibt es beispielsweise im Handel keine Schwefelsäure, die absolut ammoniakfrei wäre. In solchen Fällen ist es nicht zweckmäßig, eine noch weitere Reinigung anzustreben: man arbeitet mit den nicht ganz reinen Reagentien, bestimmt aber vor der Ingebrauchnahme die Größe des betreffenden Fehlers, welcher dann in alle Berechnungen eingesetzt wird. Solche Bestimmungen sind jedesmal zu wiederholen, wenn man eine neue Packung der Substanz anbricht. Während des Gebrauches ist dafür Sorge zu tragen, daß eine Veränderung nicht eintritt. In diesem Sinne ist auch das destillierte Wasser dauernd zu kontrollieren. Für manche Zwecke ist doppelt-destilliertes Wasser zu verwenden, das sorgfältig aufgehoben werden muß. Die für die Mikromethodik bestimmten Reagentien sind in gut verschlossenen Flaschen aufzubewahren: unter besonderen Umständen kann man das Eindringen schädigender Substanzen durch besondere Maßnahmen hintenanhalten, beispielsweise die Flasche mit der für die Mikrokjeldahlmethodik bestimmten Schwefelsäure mit einem Verschluß in der Art einer mit Schwefelsäure gefüllten Gaswaschflasche zur Zurückhaltung des Ammoniaks versehen. Den Räumen, in denen Analysen ausgeführt werden, sind solche Dämpfe und Gase, welche die Reaktion beeinflussen können, selbstverständlich fernzuhalten; die Ausführung einer Mikrokjedahldestillation in einem Raum mit Ammoniakdämpfen ohne besondere Vorsichtsmaßregeln zur Zurückhaltung des Ammoniaks (vgl. S. 35, 42) führt naturgemäß zu den schwersten Fehlern.

Von allgemein gebrauchten Apparaten ist zunächst die Luftpumpe zu erwähnen, die außer zur Erzielung eines Vakuums in Saugflaschen, Exsikkatoren bei der Destillation wie auch beim Absaugen schädlicher Dämpfe (S. 43) gebraucht wird. Für die in Frage kommenden Zwecke eignet sich am besten die einfache Wasserstrahlpumpe, die an jede Leitung mit nicht zu geringem Druck angeschlossen werden kann. Für viele Verfahren ist das Vorhandensein einer Zentrifuge erforderlich. Je größer

ihre Umdrehungszahl, desto schneller das Arbeiten; es kommen daher nur mechanisch betriebene Zentrifugen in Betracht, von denen die elektrisch betriebenen den Vorzug verdienen, da meist nur sie die erforderlichen 3000—4000 Touren in der Minute machen. Um ein unnötig langes Zentrifugieren zu vermeiden — bei der Arbeit wird häufig daran vergessen, die Zentrifuge zur Zeit abzustellen — schaltet man zweckmäßig einen automatischen Ausschalter ein, der nach einer bestimmten, jedesmal einzustellenden Zeit die Zentrifuge selbsttätig zum Stehen bringt. Die neuen an Ketten aufgehängten Zentrifugen haben sich sehr gut bewährt. Es sei das sehr genaue Auswiegen der Zentrifugenbecher mit Inhalt betont: nur wenn die gegenüberliegenden Behälter im Gewichte vollständig gleich sind, kann die Abschleuderung in erwünschter scharfer Weise erfolgen und die Zentrifuge vor Schädigung bewahrt bleiben. Es sind daher stets vor jedem Zentrifugieren die Becher mit Inhalt gegeneinander auszutarieren. Natürlich darf auch nicht vergessen werden, die Zentrifuge regelmäßig zu schmieren. Am besten verwendet man für Zentrifugengläser nur Jenaer Glas, bzw. Pyrex-Glas. In solchen Gläsern kann man sogar Veraschungen geringer Substanzmengen im Sandbad bei 150—200° vornehmen und kann, ohne umzugießen, im selben Glas fällen, auswaschen und titrieren.

Als besonders zweckmäßig haben sich für viele Versuche Zentrifugengläser mit konisch ausgebildetem Boden (Abb. 1) erwiesen. Besonders bei sparsamen Niederschlägen schützen sie gegen Verluste. Sie dürfen jedoch nicht zu stark zugespitzt sein: es ist dann schwer, die zu sehr eingedrückten Niederschläge zur Titration etc. in Lösung zu bringen, anderseits die Gläser gut zu reinigen. Gelegentlich leisten Zentrifugengläser mit eingeschliffenem Glasstopfen gute Dienste.

Abb. 1.



Abb. 2.

Für besondere Zwecke werden Zentrifugengefäße aus glühfester Porzellanmasse verwendet (Abb. 2). Diese ver-

einigen in sich die Eigenschaften eines Zentrifugengefäßes und eines Porzellantiegels. Es kann in ihnen ohne umzugießen verascht, gefällt, ausgewaschen, geglüht und gewogen werden. Hiezu wird eine Drahtschlinge unter dem Wulst des Röhrchens herumgelegt, mit welcher es am Haken der Analysenwaage aufgehängt wird.

Messen und Wägen.

Besondere Aufmerksamkeit erfordert das Messen und Wägen. Bei den biochemischen Untersuchungsmethoden, die hier geschildert werden, ist eine Mikrowage im eigentlichen Sinne nicht erforderlich. Sämtliche Wägungen, die hier in Betracht kommen, können mit einer empfindlichen chemischen Analysenwage ausgeführt werden: das gilt sowohl für die Herstellung von Reagenzlösungen wie für die Wägung von Niederschlägen. Bei Herstellung von Reagentienlösungen, insbesondere bei der Bereitung von Testlösungen sind, um die Wägefehler möglichst zu reduzieren, als Ausgangsmaterial nicht zu kleine Quantitäten zu wählen und die erforderliche Konzentration lieber durch Verdünnung herzustellen. Für das System der Mikroanalyse des Blutes nach Bang genügt im Notfalle ebenfalls jede Analysenwage, besonders Ketten-Wagen, wie sie von amerikanischen Firmen hergestellt werden, sind geeignet; es ist jedoch dann erforderlich, daß die notwendigen Gewichte sofort zur Hand sind, da diese Wägungen außerordentlich schnell ausgeführt werden müssen. Diese Notwendigkeit der sehr schnellen Wägung, die dadurch bedingt ist, daß das in kleinen Löschpapierblättchen aufgesaugte Blut durch Wasserverdunstung sehr bald an Gewicht verliert, hat zur Anwendung von sehr schnell arbeitenden Torsionswagen geführt, z. B. der von Hartmann & Braun, Frankfurt a. M.

Besondere Wichtigkeit kommt den messenden Methoden zu. Es gelten hier im wesentlichen die gleichen Vorschriften wie bei den Makrobestimmungsmethoden; es ist auf größte Genauigkeit der Meßgefäße Gewicht zu legen. Die verwendeten Pipetten prüfe man vorher genau, wenn nötig durch Auskalibrieren mit Quecksilber;

am besten, wenn auch recht teuer, sind staatlich geeichte Pipetten. Sonst verwende man für die gleichen Zwecke stets die gleichen Pipetten, stelle insbesondere fest, ob die Pipetten auf Abstreichen oder auf Ausblasen geeicht sind, und vergesse nie, dieselbe Pipette stets in der gleichen Weise zu verwenden. Wenn möglich, arbeite man mit Vollpipetten, die in genügender Menge sauber und trocken zur Hand sein müssen. Wenn anomale Maße gebraucht werden (z. B. bei der Bangschen Zuckerbestimmung Pipetten von 6,5 ccm Inhalt), so lasse man sie besonders anfertigen. Man wird trotzdem die Meßpipetten nicht entbehren können. Hier verwende man, wenn möglich, nur geeichte Pipetten, die aber nicht bis zum Ende kalibriert sein dürfen, da die Abmessung des Restes Schwierigkeiten macht. Sie müssen in allen Größen vorhanden sein, so daß man für jede abzumessende Menge eine passende Pipette verwenden kann. Man gebrauche stets die Meßpipette, deren Gesamtinhalt die abzumessende Flüssigkeitsmenge nur wenig übertrifft: zur Abmessung von 2,6 ccm z. B. eine 5-ccm-Pipette, für 7,5 ccm eine 10-ccm-Pipette.

Das gleiche wie für die Pipetten gilt für die Büretten. Für manche Zwecke der Mikroanalyse genügen gewöhnliche, in $^1/_{20}$ ccm geteilte Büretten; für spezielle Zwecke sind Mikrobüretten erforderlich, die in $^1/_{100}$ ccm eingeteilt sind. Während bei den gewöhnlichen Büretten unter Umständen ein Klemmverschluß genügt, müssen diese Mikrobüretten unbedingt mit einem Glashahn versehen sein. Man achte darauf, daß die Hähne nicht zu stark gefettet werden. Die Tropfengröße muß eine so geringe sein, daß ein Tropfen ungefähr 2 Teilstrichen der Bürette entspricht. Da eine Füllung dieser Apparate, die naturgemäß ein sehr enges Rohr haben, in direkter Weise mit Schwierigkeit verknüpft ist, sind diese Büretten so konstruiert, daß ein am unteren Teil abgehendes kommunizierendes Rohr, das durch einen Glashahn gegen die Bürette abgeschlossen werden kann, an seinem oberen Ende in einem Vorratsgefäß endigt, welches imstande ist, so viel Flüssigkeit aufzunehmen, daß man die Bürette daraus 8—10mal auffüllen kann (s. Abb. 3). Das Rohr sei nicht

zu eng, ebenso sei der Hals des Reservoirs weit genug, um die Lösung bequem eingießen zu können, ohne daß sich schwer entfernbare Luftblasen zwischen die Flüssigkeit setzen. Für Flüssigkeiten, welche durch Licht verändert werden, werden Büretten benutzt, bei denen Vorratsgefäß und der zur Bürette führende Schenkel aus braunem Glase gefertigt sind (Abb. 4). Für die Bürette selbst, die ja nur für kurze Zeit mit der Flüssigkeit gefüllt ist, nimmt man weißes Glas, damit die Ablesung nicht erschwert ist. Um Eindringen von CO_2, NH_3 pp. aus der Luft, die eine Änderung des Titers veranlassen können, zu verhindern, schaltet man ein Absorptionsgefäß vor. Wenn möglich, sollen die Büretten hinten weiß hinterlegt sein, einen „Schellbachstreifen" tragen.

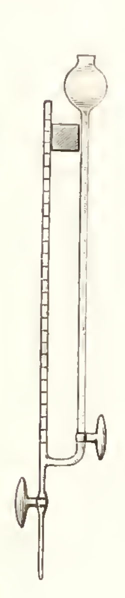


Abb. 3.



Abb. 4.

Auf die Herstellung der Maßflüssigkeiten ist größte Sorgfalt zu verwenden. Besonders ist zu beachten, daß eine große Zahl von Titrierlösungen, besonders sehr geringer Konzentration, sich schlecht hält und bald ihren Titer ändert. Das gilt in erster Linie von der Jodlösung und der Natriumthiosulfatlösung, die jedesmal frisch aus höher konzentrierten Lösungen, die selbstverständlich auch nachkontrolliert werden müssen, zu bereiten sind. Man hält sich zweckmäßig $^1/_{10}$ Normallösungen, die man entweder fertig bezieht oder selbst nach den Regeln der Maßanalyse herstellt, und bereitet aus ihnen die für den betreffenden Tag erforderlichen Mengen der gebrauchten Lösung. Wo der Transport fertiger Lösungen schwierig und teuer ist, kann man auch von fabrikmäßig hergestellten, in Ampullen eingeschmolzenen Salzen, bzw. konzentrierten Lösungen ausgehen (Fixanal oder ähnliche Präparate), die nach Anweisung aufgelöst, ohne Wägung u. dgl. $^1/_{10}$ Normallösungen ergeben. Vor allem müssen auch ver-

schiedene Maßflüssigkeiten, mit denen gegeneinander titriert wird — z. B. Silbernitrat und Rhodanammonium bei der Chlorbestimmung — genau aufeinander eingestellt sein. Lösungen von Säuren, Laugen, auch von Silbernitrat, wenn in dunkler Flasche gegen Licht geschützt aufbewahrt, halten sich auch in geringen Konzentrationen. Alle Lösungen sind, bevor man sie zum Füllen der Büretten usw. verwendet, gut durchzumischen, da besonders bei niederer Temperatur viel Lösungen sehr leicht „entmischen".

Am besten verwendet man ganz trockene Pipetten bzw. Büretten. Noch etwas feuchte sind mit der betreffenden Lösung, die man mit ihnen abmessen will, wiederholt so durchzuspülen, daß man bei Pipetten etwas der Lösung in ein sauberes trockenes Reagenzglas einfüllt, die Lösung in die Pipette hochzieht, durchspült und auslaufen läßt. In ein anderes trockenes Reagenzglas gibt man wieder etwas frische Lösung und verfährt ebenso und wiederholt diese Prozedur am besten noch ein drittes Mal. Bei Büretten verfährt man sinngemäß, läßt natürlich die Flüssigkeit durch die ganze Bürette laufen und läßt sie schließlich durch den Hahn austreten. Auch hier wiederholt man die Prozedur mindestens ein zweites Mal. Die zum Ausspülen benutzten Lösungen sind natürlich fortzugießen. Man hüte sich insbesondere, mit Pipetten aus Originalflaschen die Normallösungen direkt zu entnehmen, da hiedurch die Konzentration beeinflußt und die Lösung für genaue Versuche unverwendbar werden kann.

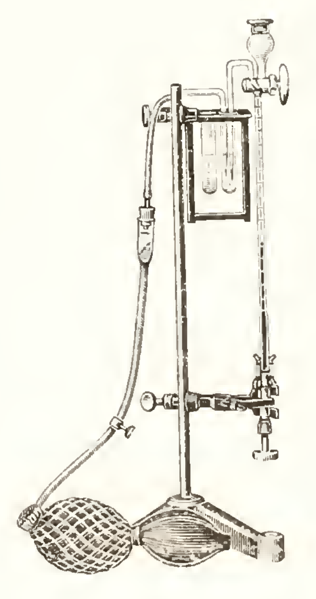


Abb. 5

Nach Untersuchungen von Bjerrum, Rehberg und anderen ist es für Titrationen erheblich günstiger, mit konzentrierten als mit verdünnten Lösungen zu arbeiten. In ersterem Falle ist die Fehlerquelle kleiner, der Umschlag deutlicher. Die nachfolgend geschilderte Einrichtung (Mikrotitrationsapparat) ist in diesem Sinne konstruiert ((Abb. 5).

Das Hauptstück der Bürette besteht aus einem fast kapillaren Rohre, das zwischen den Marken 0,1 ccm faßt. Dieser Zwischenraum ist in 100 Teile geteilt, so daß Kubikmillimeter direkt abgelesen, bis 1/4 cmm bei Anwendung einer Lupe geschätzt werden können. An seinem oberen Teile trägt das Bürettenrohr einen Hahn mit zwei Wegen, deren einer zu einem Reservoir führt, während bei Umstellung des Hahnes eine Verbindung mit einem Ansatzrohr zur Bürette geschaffen wird, das, von demselben Kaliber wie diese, zweimal rechtwinklig umgebogen ist und in einer ziemlich feinen Spitze endet. Das untere Ende der Bürette trägt einen Schliff, auf den ein etwas weiterer Teil aufgesetzt werden kann, in welchen eine feingängige Eisenschraube absolut dicht eingelassen ist. Dieser untere Teil wird, nachdem die Eisenschraube ziemlich tief gestellt ist, mit Quecksilber gefüllt und nunmehr der ganze Teil fest auf den Schliff des Hauptteiles aufgesetzt. Durch Metallspiralen wird eine feste Verbindung zwischen den beiden Teilen gewährleistet. Durch Drehen der Schraube kann nun das Quecksilber mehr oder weniger hoch in die Bürette eingetrieben werden.

Diese ganze Einrichtung ist an einem Stativ befestigt, das außerdem ein verschiebbares Gestell trägt, in welches zwei Reagenzgläser (12 × 100) eingesetzt werden können. Dabei sind die Abstände so gewählt, daß das Ansatzstück der Bürette gerade in die Mitte des einen Reagenzglases trifft und mit seiner Spitze bis kurz über den Boden reicht. Während dieses Reagenzglas zur Aufnahme der zu titrierenden Flüssigkeit dient, wird in ein daneben stehendes eine Lösung mit dem bei der Titration zu erreichenden Farbton gegeben. Eine hinter den Gläsern angebrachte Milchglasscheibe dient dazu, das Ende der Titration (bei auffallendem Lichte) schärfer erkennen zu lassen. In das für die Titration benutzte Reagenzglas ragt außerdem noch ein fein ausgezogenes Glasrohr, welches durch einen Schlauch mit einem Doppelgebläse verbunden ist, so daß die Flüssigkeit durch Luftdurchleitung dauernd in Bewegung gehalten wird. Zur Regulierung der Luftzufuhr befindet sich an dem Schlauche eine einfache Klemmschraube; es ist auf diese Weise möglich, durch einmaliges Aufpumpen des Gebläses automatisch längere Zeit Luftblasen durch die Titrierflüssigkeit durchgehen zu lassen. Um eventuell schädliche Gase, z. B. Kohlensäure, abzuhalten, wird ein mit passender Füllung versehenes, also z. B. mit Natronkalk gefülltes Glasrohr, zwischengeschaltet.

Das Arbeiten mit dem Apparat geschieht in folgender Weise. Nachdem der Mikrotitrationsapparat in der oben geschilderten Art zusammengesetzt ist, wird der Hahn am oberen Ende so eingestellt, daß eine Verbindung zwischen Bürette und Reservoir besteht. Nun wird durch Drehen der Eisenschraube das Quecksilber bis in die Bohrung des Hahnes hochgetrieben und nun das Reservoir mit der Titrierflüssigkeit gefüllt. Durch Senken des Quecksilbers wird die Flüssigkeit in die Bürette hereingezogen, der Hahn nun umgestellt und die Flüssigkeit so weit hochgedrückt, daß sie das Ansatzstück, einschließlich der Spitze, vollkommen füllt. Nach wiederholter Umstellung des Hahnes wird durch Senken

des Quecksilbers neue Lösung in die Pipette, am besten bis zur Marke 0, eingesaugt; nachdem der Hahn nun wieder umgestellt ist, ist die Bürette zum Gebrauch bereit.

Es wird nunmehr die zu titrierende Lösung mit Indikator in dem Reagenzglas in das Gestell eingesetzt (daneben, wenn gewünscht, die Kontrollprobe mit der Titrationsendfarbe) und das Gestell so weit gehoben, daß das ganz gefüllte, äußerlich aber von Titrationsflüssigkeit freie Ansatzrohr bis fast auf den Boden reicht. Zugleich wird das für die Luftdurchleitung bestimmte feine Rohr eingesetzt und, wie oben beschrieben, vorsichtig Luft (zwei bis drei Bläschen pro Sekunde) durchgeleitet. Durch Betätigung der Eisenschraube wird die Titrierflüssigkeit in die Lösung hineingetrieben, bis der Umschlag erfolgt ist. Die Vorrichtung erlaubt genaueste Zugabe. Es wird dann mit Hilfe einer Lupe abgelesen und im übrigen wie gewöhnlich verfahren.

Genügt die in der Bürette befindliche Lösung nicht zur Beendigung der Titration, wird, nachdem die Marke 0,1 erreicht ist, der Hahn umgestellt, neue Lösung aus dem Reservoir eingefüllt und nach Rückdrehung weiter titriert. In derselben Weise verfährt man, wenn man mit derselben Lösung mehrere Titrationen ausführen will.

Will man dieselbe Bürette für eine andere Titrationsflüssigkeit benutzen, entleert man zunächst die in der Bürette befindliche Flüssigkeit in das Reservoir, dreht den Hahn um, zieht aus dem Ansatzstück die Lösung in die Bürette hinein und bringt auch diese nach Rückdrehung des Hahnes in das Reservoir. Dieses kann nun mit einer Pipette oder dergleichen entleert werden; man füllt es dann zunächst mit Wasser, wäscht damit Bürette und Ansatzstück aus und tut dasselbe mit der neuen Titrierflüssigkeit. Praktischer ist es, für jede Flüssigkeit ein neues Hauptstück mit Hahn und Ansatzstück zur Verfügung zu haben, das auf das vorhandene Unterteil paßt.

Will man zum Titrieren Lösungen verwenden, welche gegen Quecksilber nicht indifferent sind, so ist es nur nötig, zwischen Lösung und Quecksilber eine kleine Luftblase einzuschalten. In diesem Falle verfährt man so, daß man beim Füllen der Bürette das Quecksilber nicht ganz bis oben drückt; beim Einziehen der Lösung aus dem Reservoir bleibt dann zwischen Quecksilber und Lösung eine Luftblase, die in keiner Weise stört und immer mit dem Quecksilber mitgeht. Sie muß berücksichtigt werden, wenn man die Ablesungen macht; der Stand der Flüssigkeit muß natürlich von ihrer Grenze gegen die Luftblase gerechnet werden.

Kolorimetrische Methoden.

Besondere Wichtigkeit haben für die Mikrobestimmungen die kolorimetrischen Methoden erlangt. Ich empfehle sie grundsätzlich nur in solchen Fällen, in denen es mit den maßanalytischen Methoden nicht gelingt, genügend scharfe

Ausschläge zu erhalten. In allen Fällen, wo die sehr empfindliche Maßanalyse, besonders die jodometrische Bestimmung, scharfe Umschläge ergibt, ist diese der kolorimetrischen Bestimmungsmethode vorzuziehen, vor allem deshalb, weil sie frei von subjektiven Fehlern ist, so daß ohne Schaden für die Genauigkeit z. B. die laufenden Bestimmungen einer Versuchsreihe auch von verschiedenen gut eingearbeiteten Personen ohne weiteres ausgeführt werden können.

Bei der kolorimetrischen Methode zeigen sich für die Augen verschiedener Personen deutliche Differenzen, da der Begriff gleicher Farbenintensität, auf den es bei der Kolorimetrie ankommt, individuell verschieden ist. Demnach wird die Titration von mehreren Personen ohne weiteres ganz gleichmäßig ausgeführt: bei der kolorimetrischen Bestimmung dagegen zeigen verschiedene Individuen typische Differenzen der Ablesung, die zwar immer konstant bleiben und die Resultate durchaus einwandfrei erscheinen lassen, wenn die Ablesung immer von derselben Person erfolgt, bei Wechsel des Beobachters aber zu erheblichen Fehlern führen können. Im übrigen sind die mit der kolorimetrischen Methode erhaltenen Resultate — selbstverständlich bei genauer Einhaltung der Versuchsbedingungen — vorzüglich. Über objektive Kolorimetrie s. u.

Sämtliche Kolorimeter bestimmen die Konzentration einer gefärbten Lösung durch Vergleich mit der bekannten Konzentration einer gleichgefärbten Lösung aus dem Verhältnis der Schichtdicken dieser beiden Lösungen, wenn beide dem beobachtenden Auge gleich hell erscheinen. Es besteht für den Fall der Farbengleichheit das einfache Gesetz, daß die Schichtdicken umgekehrt proportional den Konzentrationen sind: ist c die Konzentration der zu bestimmenden Lösung, c_1 die Konzentration einer Lösung bekannten Gehaltes und sind s und s_1 die Schichtdicken der zu bestimmenden bzw. der bekannten Lösung, wenn die Farbtiefen beider dem Auge gleich erscheinen, so gilt das Verhältnis

$$c : c_1 = s_1 : s\,.$$

Bekannt sind in dieser Proportion die beiden Schichtdicken, die man an jedem Kolorimeter durch eine entsprechende Vorrichtung ermitteln kann, und die Konzentration der bekannten Vergleichslösung, so daß wir mit Hilfe der kolorimetrischen Ablesung

$$c = \frac{c_1 \cdot s_1}{s}$$

bestimmen können.

Die meisten der auch für die Mikroanalyse brauchbaren Kolorimeter beruhen auf dem Konstruktionsprinzip von Dubosq, das nachfolgend beschrieben werden soll (s. Abb. 6). In zwei Glaströge T und T_1, die unten einen glatten, gläsernen Boden haben, werden die zu vergleichenden gefärbten Flüssigkeiten eingefüllt. Durch mehr oder weniger tiefes Eintauchen von Glasstäben kann man die Schichtdicke, durch eine Skala kontrolliert, variieren Durch einen Spiegel M wird das Licht durch die Tröge T und T_1 und die in sie eintauchenden Glasstäbe in die Prismen P und P_1 geworfen, von denen es durch ein Linsensystem in das Auge gelangt; so ist es möglich, die Färbungen der beiden Tröge nebeneinander als Hälften eines Kreises zu beobachten. Nachdem man die Kontrollösung auf eine gewisse Schichtdicke, z. B. 40 mm eingestellt hat, variiert man durch mehr oder minder tiefes Eintauchen des anderen Glasstabes die Schichtdicke der Versuchsflüssigkeit so lange, bis dem Auge die beiden Hälften des Kreises gleich stark gefärbt erscheinen. Man darf sich mit einer Ablesung nicht begnügen, sondern muß eine ganze Anzahl machen, deren Mittel man dann nimmt. Zweckmäßig ist es hiebei, das eine Mal von geringerer zu höherer Färbung, das andere Mal von höherer zu geringerer Färbung vorzugehen. Die Berechnung ergibt sich aus dem oben Gesagten.

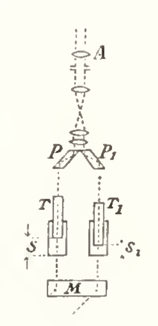


Abb. 6.

Es sind eine große Anzahl Kolorimeter konstruiert worden, welche zwar alle dem gleichen Prinzipe folgen, in ihrer Konstruktion aber vielfach verschieden sind.

In einer Reihe von Kolorimetern ist nur die eine Schichtdicke verstellbar, während die andere, und zwar meist die Schichtdicke der Versuchslösung, stets die gleiche bleibt. Um eine Einstellung zu ermöglichen, befindet sich die — entweder jedesmal frisch herzustellende oder auch ein für allemal fertige — Vergleichslösung in einem

Hohlkeil, der an seinem dicksten Ende die höchste, an seinem dünnen Ende die geringste Schichtdicke = Null besitzt und der so verschoben werden kann, daß nacheinander alle Schichtdicken in gleicher Höhe mit der Vergleichslösung stehen können. Durch eine Skala kann man die Schichtdicke der Vergleichslösung feststellen und, da ja die Schichtdicke der Versuchslösung bekannt ist (sie entspricht der dicksten Stelle des Keiles), aus dem Vergleich unter Anwendung der gewöhnlichen Formel den Gehalt der Versuchslösung feststellen. Bei manchen Modellen läßt sich aus der Stellung des Keiles bei Farbengleichheit mit der Versuchslösung mit Hilfe von Tabellen direkt der Gehalt an der gesuchten Substanz ablesen. Im allgemeinen stehen diese Apparate den anderen an Genauigkeit nach und eignen sich mehr für ungefähre Bestimmungen.

Diesen „subjektiven" Meßmethoden stehen „objektive" gegenüber, welche die Lichtabsorption der zu vergleichenden Lösungen mit Hilfe lichtempfindlicher elektrischer Zellen prüfen. Diese Apparaturen schalten individuelle Beobachtungsdifferenzen aus. Die für die verschiedenen Spektralbereiche verschiedene Empfindlichkeit der lichtelektrischen Zellen steht jedoch ihrer allgemeinen Anwendung noch im Wege.

Die Handhabung der Kolorimeter erfordert gewisse Vorsichtsmaßregeln. Tageslicht eignet sich nur für einfache Apparate. Sonst arbeitet man mit dem Kolorimeter im Dunkelzimmer. Als Lichtquelle verwendet man am besten eine gewöhnliche Glühlampe mit mattierter Birne. Die Lichtquelle muß, was durch Verstellen auszuproben ist, so aufgestellt sein, daß bei ungefülltem Kolorimeter oder, wenn in die beiden Tröge die gleiche Farblösung eingefüllt ist, bei gleicher Einstellung die beiden Teile des Gesichtsfeldes durchaus gleich erscheinen. Dieser Zustand muß auf jeden Fall vor der Benutzung erreicht sein. Er ist bei jedem guten Kolorimeter, das ausreichend optisch korrigiert ist, zu erzielen. Natürlich muß nicht nur das optische System, sondern der ganze Apparat, vor allem die Eintauchstäbe und die zur Aufnahme der Flüssigkeiten dienenden Tröge peinlich sauber gehalten

werden. Schon Staubauflagerung gibt bei den feinen Apparaten Ausschläge. Bei fortlaufenden kolorimetrischen Ablesungen ist die gleiche Lichtquelle und ihre gleiche Lage beizubehalten. Um dies zu erreichen, wird am besten sowohl der Apparat wie die Lichtquelle unverrückbar aufgestellt, mechanisch an dem Arbeitstisch befestigt. Bei manchen Apparaten ist die Lichtquelle fest mit dem Kolorimeter verbunden, so daß die Einstellung fortfällt. Diese Vorrichtungen sind sehr zweckmäßig, da die Ablesung nicht durch Seitenlicht beeinflußt wird und man praktisch im Dunkeln kolorimetriert. Die zur Kolorimetrie kommenden Farblösungen müssen absolut klar sein: jede Trübung verändert die Ablesung. Ein Filtrieren unklarer Lösungen führt nur selten zum erwünschten Ziel, in manchen Fällen werden auch färbende Substanzen durch das Filter zurückgehalten. Bei den hier beschriebenen kolorimetrischen Methoden werden bei richtigem Arbeiten durchweg klare Lösungen erzielt. Es ist also, wenn nicht klare Lösungen erhalten wurden, das beste, den Versuch nochmals genau nach der Vorschrift zu wiederholen.

Verschiedene Färbungen lassen sich verschieden gut kolorimetrisch bestimmen: am besten blaue, am schlechtesten gelbe. Oftmals wird die Ablesung durch Vorsetzen eines passenden farbigen Glases, das nur die zu prüfende Färbung durchläßt, erleichtert. Die exaktesten Resultate erhält man bei Benutzung eines „Monochromators", der direkt an den Apparat angesetzt wird und, verstellbar, nur das Licht des gewünschten Wellenbereiches durchläßt.

Die zur Bestimmung der Färbung einer Versuchslösung erforderlichen V e r g l e i c h s l ö s u n g e n bekannter Konzentration können auf verschiedene Weise hergestellt werden. Die einfachste und korrekteste Art ist die, daß Lösungen bestimmter Konzentration desselben Stoffes, der bestimmt werden soll, in ganz gleicher Weise behandelt werden wie die Versuchslösungen und daß durch Vergleich der Intensität der in der Versuchslösung erzeugten Färbung mit der der Vergleichslösung von bekanntem Gehalt die Konzentration der ersteren an dem gesuchten Stoffe festgestellt wird. In diesem Fall muß also auch die Färbung

der Vergleichslösung jedesmal frisch hergestellt werden. Man kann diese Arbeit für manche Zwecke umgehen, indem man aus bekannten farbechten Substanzen — gefärbten Salzen, Farbstoffen — eine Lösung herstellt, welche genau dieselbe Farbe und Farbenintensität aufweist wie eine Lösung bestimmter Konzentration des zu prüfenden Stoffes nach vorschriftsmäßiger Behandlung.

Die bei der Kolorimetrie erhaltenen Werte werden um so besser sein, je näher die Farbtiefen von Versuchslösung und Vergleichslösung liegen. Das Verhältnis der Schichtdicken soll im allgemeinen nicht über 1 : 2 bzw. 2 : 1 hinausgehen. Ist die Verschiedenheit der Farbtiefe größer, so ändert man die Konzentration der Vergleichslösung oder der Versuchslösung, so daß man entsprechende Verhältnisse schafft.

Nephelometrie.

Die nephelometrische Methodik verfolgt dieselben Ziele wie die kolorimetrische. Sie vergleicht aber nicht Färbungen, sondern die Trübungen, die auf Zusatz gewisser Reagentien in der Vergleichs- und in der Kontrollösung erzeugt wurden.

Genaue nephelometrische Untersuchungen begegnen heute noch ziemlich erheblichen Schwierigkeiten, insbesondere ist die Herstellung einer gleichmäßigen, feinverteilten Trübung recht schwierig. Die Verfahren müssen sehr genau ausgearbeitet sein: peinliche Beobachtung der Vorschriften ist unerläßlich. Irgendwelche sekundäre Trübungen (aus Verunreinigungen od. dgl.) machen die nephelometrische Analyse ganz unmöglich, ebenso den Gefäßen, auch äußerlich, anhaftende Unreinigkeiten. Schon eine dünne Fettschicht auf den Gläsern, die durch Anfassen mit der bloßen Hand erzeugt wird, kann Lichtstrahlen abbeugen und so Fehler veranlassen.

Abb. 7 zeigt einen schematischen Längsschnitt durch eine Hälfte eines Nephelometers. — Auf das zylindrische Glasgefäß a fällt ein praktisch paralleles Lichtbündel, das von einer 1 m entfernten Lampe geliefert wird, und erzeugt in der getrübten Lösung einen Tyndall-Kegel.

Dieser wird begrenzt durch zwei scharfschneidige Platten, do und du, von denen die obere fixiert, die untere beweglich ist: der Abstand der beiden Schneiden wird an einer Skala abgelesen. Das abgebeugte Licht, dessen Menge also von dem Abstand der Schneiden abhängig ist, gelangt durch einen massiven Glaskörper c, der in die zu untersuchende Lösung eintaucht, durch ein Linsensystem in das Okular. In diesem entspricht je eine Hälfte einer der symmetrischen Nephelometerhälften bzw. einem Tyndall-Kegel. Befinden sich in den Gefäßen optisch leere Flüssigkeiten, so findet eine Abbeugung nicht statt: die Okularhälften sind dunkel; sind die Flüssigkeiten getrübt, erscheinen die betreffenden Okularhälften mehr oder weniger hell, je nach der Trübung und der Höhe der bestrahlten Schicht. Bei gleichmäßigen Trübungen verschiedenen Grades kann man durch Veränderung der Höhe der durchstrahlten Lösungen in den beiden Okularhälften gleiche Helligkeit erzeugen. Befindet sich in dem einen Glasgefäß eine Lösung bekannten Gehaltes, in dem anderen eine Lösung unbekannten Gehaltes desselben Stoffes, kann man, ganz ebenso wie bei der kolorimetrischen Messung, den Gehalt der unbekannten Lösung berechnen. Ist c die Konzentration der unbekannten, c_1 die der bekannten Lösung, s und s_1 die entsprechenden Schichtdicken, so ist

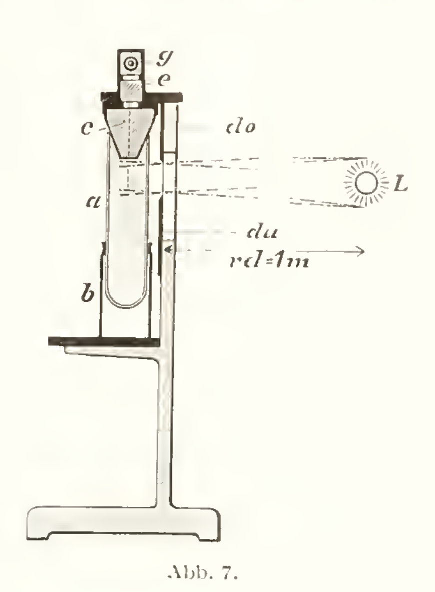


Abb. 7.

$$c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}.$$

Im übrigen ist die Handhabung des Nephelometers die gleiche wie die des Kolorimeters. Apparat und Lichtquelle sind genau gegeneinander auszurichten, am besten unbeweglich zu fixieren. Peinlichste Sauberkeit ist, viel-

leicht in noch höherem Grade als bei den Kolorimetern, erforderlich. Die Gefäße sind, auch äußerlich, peinlichst zu reinigen und später, auch beim Einsetzen in den Apparat, nur mit einem Leinenlappen od. dgl. anzufassen. Die massiven Glaskörper müssen gerade in die Flüssigkeiten eintauchen: diese müssen frei von Luftblasen sein, insbesondere dürfen sich solche nicht an der Grenze von Glaskörper und Flüssigkeit befinden.

Bestimmungen der Harnbestandteile in kleinen Mengen.

Die hier beschriebenen Methoden entsprechen zum Teil den üblichen für größere Mengen bestimmten, sind jedoch so abgeändert, daß die Ergebnisse auch bei Verwendung dieser kleinen Mengen durchaus zuverlässig sind.

Bestimmung der gesamten Halogene (bes. Chloride).

1. Volhardsche Methode.

Prinzip: $AgNO_3$ wird in größerer Menge als zur Fällung der Halogene erforderlich, zugegeben. Der Überschuß wird durch Rhodan gebunden. Die Rotfärbung des zugesetzten Indikators (Bildung von Rhodaneisen) zeigt die Beendigung der Sättigung des überschüssigen $Ag^{\cdot}$ an.

Benötigte Lösungen: 1. $^1/_{50}$ Normal-Silbernitratlösung, 2. $^1/_{50}$ Normal-Rhodanammoniumlösung, 3. verdünnte Salpetersäure, 4. Eisenoxydammoniakalaun, gepulvert.

5—10 ccm einer Harnverdünnung 1 : 10 — enthält der Harn Eiweiß, ist dieses vorher durch Aufkochen und Zugabe von einigen Tropfen Salpetersäure zu entfernen — werden in einem kleinen Gefäß mit 1—2 ccm Salpetersäure und einer Messerspitze Alaun (4) versetzt, und aus einer in $^1/_{50}$ ccm geteilten Bürette mit Glashahn im Überschuß Silbernitrat zugefügt und durchgemischt. Man gibt nun aus einer anderen gleichen Bürette von der Rhodanammonlösung zu, bis gerade Rotfärbung auftritt. Aus der zugegebenen Silbernitratlösung abzüglich der zum Zurück-

titrieren verbrauchten Rhodanlösung ergibt sich die Menge der verbrauchten Silberlösung, bzw. des gebildeten Chlorsilbers und daraus die Menge der Halogene, im wesentlichen also der Chloride. Dunkel gefärbte Harne werden, nachdem sie schon verdünnt sind, mit etwas Blutkohle geschüttelt (für ein halbes Reagenzglas genügt eine Messerspitze) und mit dem Filtrat wie oben angegeben verfahren. Da viele Sorten von Blutkohle Chlor enthalten, sind nur ganz reine Präparate zu wählen und auch diese der Sicherheit halber vorher auf Abwesenheit von Chlor zu prüfen.

Berechnung: 1 ccm $^1/_{50}$ Normal-Silbernitratlösung entspricht 0,71 mg Chlor bzw. 1,17 mg NaCl.

Beispiel: Angewandt 1 ccm Harn; es seien zugesetzt (im Überschuß) 10 ccm Silberlösung, zum Zurücktitrieren bis zur Rotfärbung seien erforderlich gewesen 1,4 ccm Rhodanlösung. Es sind also 8,6 ccm Ag-Lösung zur Bindung verbraucht. Die Chlormenge ergibt sich zu $8{,}6 \cdot 0{,}71 = 6{,}11$ mg in 1 ccm Harn, bei Berechnung des gesamten Chlors als NaCl die Menge dieses zu $8{,}6 \cdot 1{,}17 = 10{,}06$ mg NaCl in 1 ccm. 100 ccm enthalten dementsprechend 0,611 g Cl oder 1,006 g NaCl.

2. Mohrsche Methode.

Prinzip: Kaliumchromat bildet mit $Ag^{\cdot}$ rotes Chromsilber. Bei Zusatz von $AgNO_3$ werden zunächst die Halogene zu Halogensilber gebunden. Sobald die Reaktion beendet ist, tritt Rotfärbung infolge Bildung von Chromsilber auf.

Die Reaktion geht nur in neutraler Lösung.

Benötigte Reagentien. 1. n/50 Silbernitratlösung; 2. Kaliumchromatlösung 10%; 3. Natronlauge n/10.

10 ccm Harn werden in einem Meßkölbchen von 100 ccm mit n/10 Natronlauge versetzt, bis die Reaktion gegen Lackmuspapier gerade neutral geworden ist. Darauf wird mit destilliertem Wasser bis zur Marke 100 aufgefüllt, gemischt und 5 oder 10 ccm nach Zusatz von 0,5 ccm Kaliumchromatlösung mit n/50 $AgNO_3$-Lösung titriert, bis schwache Rotfärbung das Ende der Reaktion anzeigt.

Berechnung: Die verbrauchte Menge n/50 $AgNO_3$ multipliziert mit 0,71 bzw. 1,17 gibt den Cl- bzw. NaCl-Gehalt der angewandten Menge in mg.

Bei beiden Methoden ist es zweckmäßig, die Titration möglichst schnell zu beenden, da die Dunkelung des Chlorsilbers am Licht die Erkennung des Farbenumschlags erschwert. Man führe die Titration möglichst bei diffusem Tageslicht aus. Künstliches Licht läßt nur bei guter Zusammensetzung — am besten sog. künstliches Tageslicht — den Farbenumschlag gut erkennen.

Bestimmung der Jodide.

Prinzip: Aus der unter Zusatz von Alkali eingedampften Harnlösung, die mit Perhydrol erhitzt wird, werden die Jodide durch Wasser aufgenommen, das Jod freigemacht, in Schwefelkohlenstoff aufgenommen und mit Thiosulfat titriert.

Nötige Reagentien: 1. Mischung von Kaliumcarbonat und Natriumcarbonat (beide wasserfrei) zu gleichen Teilen. 2. Perhydrol. 3. Schwefelsäure, konzentriert. 4. Natriumnitritlösung (20 g $NaNO_2$ in 40 ccm Wasser). 5. Schwefelkohlenstoff. 6. Thiosulfatlösung $^n/_{100}$.

25 ccm Harn werden in einem Nickeltiegel mit 0,2 g Carbonatmischung [1] versetzt, gut gemischt und auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft. Nach dem Abkühlen werden ca. 2 ccm Perhydrol zugefügt und nach Abklingen der ersten Reaktion auf freier, zunächst klein, dann größer gestellten Flamme ungefähr 10 Minuten vorsichtig erhitzt. Nach dem Abkühlen werden wieder ungefähr 2 ccm Perhydrol zugesetzt und wieder ungefähr 15 Minuten mäßig stark erhitzt, wobei darauf zu achten ist, daß auch die an den Seiten des Tiegels befindlichen kleinen Mengen erhitzt werden. Man läßt abkühlen, gibt ungefähr 5 ccm Wasser dazu, verteilt den Rückstand mit einem Glasstab od. dgl. gut und filtriert durch ein Papierfilter die Lösung in den kleinen in Abb. 8 dargestellten Apparat. Man wasche den Tiegel noch dreimal mit je ca. 3 ccm Wasser aus und gieße die Flüssigkeit ebenfalls durch das Filter. Mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert man die Lösung (Vorsicht, Schäumen durch Entwicklung von CO_2) und gibt jetzt 5 ccm Schwefelkohlenstoff dazu, der den Apparat bis kurz unter dem Hahnansatz füllen muß. Jetzt fügt man 2—3 Tropfen der Nitrit-

lösung (1) dazu, worauf die wässerige Flüssigkeit sich durch Ausscheidung von Jod bräunlich färben muß. Ist das nicht der Fall, so war, bei saurer Reaktion, kein Jod vorhanden. Man prüft die Reaktion und gibt, wenn nötig, noch einige Tropfen H_2SO_4 dazu. Jetzt setzt man den oberen Stopfen auf und schüttelt kräftig durch, bis die wässerige Lösung farblos geworden und der Schwefelkohlenstoff durch die Aufnahme des Jods violett gefärbt ist. (Gelegentlich den Stopfen lüften, damit Überdruck im Apparat vermieden wird.) Man läßt die Schichten sich trennen, indem man den Apparat in ein kleines Stativ stellt, und läßt dann nach Öffnen des oberen Stopfens durch den Hahn die obere, wässerige Flüssigkeit ab, achtet aber darauf, daß kein Schwefelkohlenstoff mitgeht. Man füllt in den Apparat ca. 10 ccm Wasser, schüttelt den jodhaltigen CS_2 damit durch, läßt wieder trennen und nach Absetzen das Wasser ablaufen. Diese Prozedur wiederholt man noch zweimal und titriert nach Ablassen des letzten Waschwassers die jodhaltige CS_2-Lösung mit $^n/_{100}$ Thiosulfat unter dauerndem starkem Schütteln bis zur Farblosigkeit.



Abb. 8.

Berechnung: 1 ccm $^n/_{100}$ Thiosulfatlösung entspricht 1,27 mg Jod. Der erhaltene Wert muß, da 25 ccm Harn angewendet werden, zur Bestimmung des Gehaltes in 100 ccm noch mit 4 multipliziert werden.

Beispiel: Angewandt 25 ccm Harn. Zur Titration des Jods verbraucht 1,4 ccm. In 25 ccm Harn also $1{,}27 \cdot 1{,}4 = 1{,}78$ mg Jod, in 100 ccm also 7,12 mg Jod.

Bestimmung der Phosphate[1]).

Prinzip: Durch Zusatz von Molybdänsäure und Hydrochinon und nachfolgende Reduktion wird eine Blaufärbung erzielt, welche kolorimetrisch mit der Färbung einer auf gleiche Weise behandelten Phosphatlösung bekannten Gehaltes verglichen wird.

---

[1]) Nach Bell und Doisy.

Kieselsäure und Arsensäure geben die gleiche Reaktion. Bei den geringen Mengen, in denen sie im Harn gelegentlich vorkommen, spielen sie jedoch gegenüber der großen Menge der Phosphate praktisch für die Bestimmung keine Rolle.

Gebrauchte Reagentien: 1. Molybdänsäurelösung: 50 g Ammonmolybdat werden in 1000 ccm n.H_2SO_4 unter leichtem Erwärmen gelöst und, wenn nötig, filtriert. 2. Hydrochinonlösung: 20 g Hydrochinon werden in Wasser gelöst, auf 1000 ccm aufgefüllt und 1 ccm konzentrierter H_2SO_4 zugefügt. 3. Carbonat-Sulfitlösung: 2 Teile einer 20%igen Lösung von Natriumcarbonat (+ aq) werden mit 1 Teil einer 15%igen Lösung von Natriumsulfit (+ aq) gemischt (gut verschlossen aufbewahren und längstens alle 2 Wochen neu herstellen). 4. Standardlösung: 4,386 g trocknes primäres Kaliumphosphat (für Enzymstudien nach Sörensen) werden in Wasser gelöst und die Lösung auf 1000 ccm aufgefüllt. Diese Lösung enthält im ccm 1 mg P. Sie wird zum Gebrauch auf das 20fache verdünnt, indem 5 ccm im Meßkolben auf 100 aufgefüllt werden.

a) Anorganische Phosphate.

In einen Meßkolben von 25 ccm bzw. ein Röhrchen mit einer Marke bei 25 ccm werden 2 ccm einer 10fachen Harnverdünnung, in ein anderes gleiches Gefäß 2 ccm der bereits verdünnten Standardlösung (Gehalt dieser 2 ccm 0,1 mg P) eingebracht. Zu beiden Proben wird 5 ccm Wasser zugegeben und durch leichtes Schütteln gemischt. Jetzt wird zu jeder Probe zunächst 1 ccm Molybdänsäurelösung (1) und darauf 1 ccm Hydrochinonlösung (2) zugefügt. Man läßt 5 Minuten stehen, fügt, nachdem man durch leichtes Schütteln gut gemischt hat, zu jeder Lösung 1 ccm Carbonat-Sulfitlösung (3) zu und füllt mit Wasser bis zur Marke 25 auf. Nach 5—10 Minuten wird im Kolorimeter verglichen.

Es ist darauf zu achten, daß der Harn mit Sediment zur Verwendung kommt. Besteht eine Trübung durch kristalline Ausscheidungen, so ist zur Lösung dieser leicht zu erwärmen, wenn auch dies nicht genügt, durch Zugabe von einigen Tropfen verdünnter Salzsäure eventuell ausgefallene Phosphate in Lösung zu bringen. In diesem Falle ist zur Kontrolle die gleiche Menge HCl zuzugeben. Von anderweitigen Trübungen wird zweckmäßig vorher abfiltriert.

Die Berechnung erfolgt (vgl. S. 10, 11) nach der Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wobei c_1 0,1 mg P bedeutet.

Beispiel: Es sei bei Farbengleichheit die Schichthöhe der Vergleichslösung 40, die der Harnlösung 48. Nach obengenannter Formel ergibt sich dann für den P-Gehalt in den angewandten 2 ccm verdünntem (= 0,2 ccm originalem) Harn die Menge des P zu $0{,}1 \cdot \frac{40}{48} = 0{,}083$ mg P.

Zur Ermittlung in 100 ccm Harn muß diese Zahl mit 500 multipliziert werden, so daß sich der P-Gehalt in 100 ccm Harn zu 41,5 mg ergibt. Will man die Phosphorsäure (P_2O_5) wissen, so ist diese Zahl mit 2,29 zu multiplizieren.

b) Bestimmung der gesamten Phosphate. In einen Mikrokjeldahlkolben werden 2 ccm einer 10fachen Harnverdünnung (wie oben) eingebracht und 5 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugefügt. Es wird auf einem Mikrobrenner abgedampft, bis sämtliches Wasser verdampft ist (es ist zweckmäßig, um Stoßen zu vermeiden, ein Glaskügelchen ohne Loch hereinzutun) und der Inhalt des Kölbchens schwarz zu werden beginnt. Man läßt etwas abkühlen, gibt 0,5 ccm rauchende Salpetersäure zu und erhitzt mit größer werdender Flamme, bis keine bräunlichen Dämpfe mehr entweichen, setzt dann auf die Öffnung ein kleines Trichterchen auf und erhitzt noch ungefähr 5 Minuten weiter. Es muß ein farbloser, geringer flüssiger Rückstand bleiben. Andernfalls war die Veraschung nicht vollkommen, man setzt nochmals Salpetersäure zu und verfährt wie oben angegeben. Der klare Rückstand wird nach Erkalten mit 20 ccm Wasser versetzt und nochmals aufgekocht, um noch vorhandene Salpetersäure zu entfernen. Darauf spült man den gesamten Inhalt des Kjeldahlkölbchens in einen Meßkolben von 100 ccm und spült mit 30 ccm Wasser nach. In ein zweites Meßkölbchen zu 100 gibt man 2 ccm der verdünnten Standardlösung (0,1 mg P in 2 ccm), ferner 5 Tropfen konzentrierte H_2SO_4 und ebenfalls 50 ccm Wasser. Nach leichtem Durchmischen wird zu beiden Proben zunächst 1 ccm Molybdänsäure-

lösung (1) und darauf 1 ccm Hydrochinonlösung (2) zugefügt. Man läßt 10 Minuten stehen und gibt dann in jedes Kölbchen 5 ccm Carbonat-Sulfitlösung (3), mischt leicht und füllt zur Marke auf. Vergleich im Kolorimeter und Berechnung genau so wie bei der Bestimmung der anorganischen Phosphate. Die Differenz zwischen gesamten Phosphaten und anorganischen Phosphaten ergibt die organischen Phosphate, deren Menge im normalen Harn meist sehr gering ist.

Bestimmung der Sulfate.

Prinzip: Die Sulfate werden mit Benzidinlösung ausgefällt und die Schwefelsäure durch Titration mit Natronlauge ermittelt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Benzidinreagens. 2 g Benzidin werden mit ca. 5 ccm Wasser zu einem Brei verrieben und unter reichlichem Nachspülen mit Wasser in einen Meßkolben von 1000 ccm überführt. Nach Zugabe von 2,5 ccm konzentrierter HCl (1,19) wird gut geschüttelt und mit Wasser aufgefüllt. Lösung durch leichtes Erwärmen beschleunigen. 2. Benzidinsulfatlösung: ungefähr 1 g Benzidinsulfat wird in 1 l Wasser aufgeschwemmt, gut geschüttelt und von ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wird mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. 3. Konzentrierte HCl (spezif. Gew. 1,19). 4. NaOH, 33%ig. 5. HCl verdünnt (1 Teil konzentrierte + 4 Teile Wasser). 6. NaOH n/50. 7. α-Dinitrophenol, 0,05%ige, wäßrige Lösung. 8. Phenolphthalein, 1%ige alkoholische Lösung.

a) Bestimmung der freien Schwefelsäure. In ein Zentrifugenglas von mindestens 15 ccm Fassungsraum werden 2 ccm Harn hereinpipettiert und 10 ccm Benzidinreagens (1) unter Umrühren zugefügt. Es wird 0,2 ccm Dinitrophenollösung (7) zugegeben und vorsichtig tropfenweise verdünnte HCl (5) zugefügt, bis die gelbe Farbe gerade verschwunden ist, und dazu noch 0,5 ccm HCl (5). Nach 10 Minuten wird der Niederschlag abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen (am besten mit Hilfe der S. 81 beschriebenen Vorrichtung abgeblasen), an ihrer Stelle Benzidinsulfatlösung (2) zugegeben, gemischt,

wieder zentrifugiert, abgegossen und das Verfahren nochmals wiederholt. Die letzte Waschflüssigkeit darf Kongopapier nicht bläuen, sonst muß die Waschung mit Benzidinsulfat wiederholt werden. Man gießt die Flüssigkeit ab und fügt zum Rückstand 5 ccm destilliertes Wasser. In einem Wasserbad erhitzt man das Zentrifugenglas mit Inhalt zum Kochen, fügt 5 Tropfen Phenolphthaleinlösung (8) hinzu und titriert heiß mit n/50 NaOH aus einer Mikrobürette. 1 ccm n/50 NaOH entsprechen 0,98 mg H_2SO_4.

b) Bestimmung der gesamten Schwefelsäure (freie + gebundene). 25 ccm Harn werden mit 10 ccm konzentrierter HCl (3) in einem Erlenmeyerkölbchen 15 Minuten zum gelinden Sieden erhitzt. Man läßt etwas abkühlen, gibt 1 g Blutkohle dazu und erhitzt nochmals 3 Minuten zum Sieden. (Vorsicht, schäumt leicht über!) Man überführt die durch das Erhitzen stark eingedunstete Mischung quantitativ in ein Meßkölbchen von 25 ccm und spült das Kölbchen, in welchem man erhitzt hatte, mit Wasser aus, so daß man gerade bis zur Marke 25 auffüllt. Es wird nun gut durchgemischt und durch ein Faltenfilter filtriert. Von dem klaren Filtrat werden 2 ccm in ein Zentrifugenglas überführt, 10 ccm Benzidinreagens (1) unter Mischen zugefügt und 0,2 ccm α-Dinitrophenol dazu gegeben. Die stark saure Lösung wird mit konzenzentrierter Natronlauge (4) tropfenweise solange versetzt, bis Auftreten einer Gelbfärbung Abstumpfung der Säure anzeigt. Jetzt wird wieder tropfenweise verdünnte HCl (5) gerade bis zum Verschwinden der Gelbfärbung zugefügt und weiter genau so verfahren, wie für die Bestimmung der freien Schwefelsäure beschrieben wurde. Die Titration mit n/50 NaOH ergibt die Summe der freien und der gebundenen Schwefelsäure.

Beispiel: Zur Titration der freien Schwefelsäure wurden verbraucht 2,9 ccm n/50 NaOH. Da 1 ccm n/50 NaOH 0,98 mg H_2SO_4 entspricht, so war die in 2 ccm enthaltene Menge der Schwefelsäure $2{,}9 \cdot 0{,}98 = 2{,}84$ mg; 100 ccm enthalten also 142 mg freie H_2SO_4. Zur Titration der gesamten (freien + gebundenen) H_2SO_4 wurden verbraucht 4,5 ccm NaOH, so daß sich also die Menge der gesamten H_2SO_4 in 2 ccm zu $4{,}5 \cdot 0{,}98 = 4{,}41$ mg ergibt; 100 ccm

enthalten dementsprechend 220,5 mg H_2SO_4. Die Menge der gebundenen Schwefelsäure berechnet sich aus der Differenz zu 78,5 mg in 100 ccm.

Bestimmung des Gesamtschwefels.

Prinzip: Der nicht als Schwefelsäure vorhandene Schwefel („Neutral-Schwefel") wird mit Hilfe des Benedictschen Reagens ebenfalls zu Schwefelsäure oxydiert, die hienach vorhandene Schwefelsäure, welche also dem gesamten Schwefel im Harn entspricht, in einem Porzellanzentrifugenrohr mit Bariumchloridlösung gefällt und das gebildete Bariumsulfat nach vollständigem Auswaschen und Glühen gewogen.

Gebrauchte Reagentien: 1. Benedictsches Reagens: 200 g Kupfernitrat und 50 g Kaliumchlorat ($KClO_3$) werden in Wasser gelöst und auf 1000 ccm aufgefüllt. 2. Natriumnitrat in Substanz. 3. Konzentrierte Salpetersäure (1,40). 4. Salzsäure verdünnt: 1 Teil konzentrierte Salzsäure (1,19) werden mit 4 Teilen Wasser verdünnt. 5. Bariumchloridlösung 10%ig.

5—10 ccm Harn (bei Cystinurie-Harn entsprechend weniger) werden in ein Zentrifugenröhrchen aus glühfester Porzellanmasse mit ca. 25 ccm Fassungsvermögen (vgl. S. 3) einpipettiert und ungefähr 1 g Natriumnitrat und 5 ccm Benedictsche Lösung (1) zugefügt. Das Zentrifugenröhrchen muß vorher ausgeglüht, im Exsikkator abgekühlt und genau gewogen worden sein. Man gibt ferner 1 ccm konzentrierte Salpetersäure zu und dampft die gut gemischte Lösung im Wasserbad auf kleiner Flamme vorsichtig ab, sodaß nichts herausschäumt. Nachdem die Flüssigkeit völlig fortgedampft ist, wird die Temperatur langsam gesteigert, sodaß schließlich das Zentrifugengefäß rotglühend wird. Man läßt bei dieser Temperatur noch ungefähr 5 Minuten auf der Flamme stehen und läßt dann erkalten. Man gibt darauf 10 ccm der verdünnten Salzsäure (4) hinzu, wobei sich der Rückstand glatt löst. Gehen beim Erwärmen noch einige nitrose Dämpfe fort (die Reaktionsflüssigkeit darf keine Salpetersäure mehr enthalten), so setzt man das Erwärmen noch etwas fort, gibt aber dann so viel Wasser hinzu, daß die Flüssigkeits-

menge ungefähr 10 ccm beträgt. Man erwärmt, wenn die Lösung inzwischen erkaltet sein sollte, dieselbe wieder auf 70 bis 80 Grad und fügt nun 10 ccm der auf gleiche Temperatur erwärmten Bariumchloridlösung (5) unter leichtem Rühren hinzu. Man läßt jetzt 1—2 Stunden stehen und zentrifugiert dann in einer schnell laufenden Zentrifuge das gebildete Bariumsulfat ab. Man hebert oder gießt die überstehende Flüssigkeit sorgfältig ab, gibt ungefähr 60 Grad warmes destilliertes Wasser in der gleichen Menge hinzu, indem man den Niederschlag gut darin aufrührt, zentrifugiert wieder und wiederholt dieses Verfahren so oft, bis die abgegossene Flüssigkeit auf Zusatz von Silbernitrat kein Chlor mehr anzeigt. Danach dampft man den Rest der Flüssigkeit im Zentrifugenröhrchen ab, glüht dann das Röhrchen mit Niederschlag, überführt es noch heiß in einen Exsikkator und wiegt nach Erkalten Röhrchen + Niederschlag. Die Differenz zwischen dieser Wägung und der des leeren Röhrchens ergibt die Menge des gebildeten Bariumsulfats: durch Multiplikation mit 0,1373 berechnet sich der Gehalt an Gesamtschwefel (freie und gebundene Schwefelsäure + Neutralschwefel) in der angewendeten Menge Harn.

Mit Hilfe dieser Bestimmung kann man im Verein mit der vorher geschilderten Benzidinmethode alle drei Schwefelfraktionen des Harns bestimmen. Gesamtschwefel abzüglich der als Schwefelsäure vorhandenen Schwefelmenge ergibt die Menge des Neutralschwefels.

Beispiel: Angewandt für anorganische Schwefelsäure, ebenso für Gesamtschwefelsäure (freie + Ester-Schwefelsäure) je 2 ccm Harn, für Gesamtschwefel 10 ccm Harn. Bestimmung der freien und gebundenen H_2SO_4 mit der Benzidinmethode.

1. Anorganische H_2SO_4. Angewandt 2 ccm Harn, gefunden 2,33 bzw. 2,35 mg H_2SO_4 bei Doppelbestimmung. In 100 ccm im Durchschnitt 117 mg H_2SO_4 = 38 mg S.

2. Gesamtschwefelsäure in 2 ccm Harn 3,27 bzw. 3,22 mg H_2SO_4, in 100 ccm also im Mittel 163 mg H_2SO_4 = 53 mg S. Ätherschwefelsäure also 163—117 = 46 mg H_2SO_4 mit 15 mg S.

3. Bestimmung des Gesamtschwefels. Angewandt (Doppelbestimmung) 10 ccm Harn. Gefunden 0,0197 bzw. 0,0181 g $BaSO_4$, woraus sich für 100 ccm ein S-Gehalt von 68, bzw. 67 mg errechnet, im Mittel also 67,5 mg.

Der Neutral-S in 100 ccm Harn beträgt also 67,5—53 = 14,5 mg in 100 ccm.

Nephelometrische Bestimmung des Schwefels[1].

Prinzip: Im verdünnten, mit Gelatine versetzten Harn wird durch Zusatz von Bariumchlorid feinst verteiltes Bariumsulfat ausgefällt: die erzeugte Trübung wird mit der einer in gleicher Weise behandelten Testlösung von Kaliumsulfat verglichen.

Erforderliche Reagentien: 1. n/10 Salzsäure. 2. 0,6n Natronlauge, herzustellen aus 60 ccm n/1 Natronlauge + Wasser ad 100 ccm. 3. Gelatinelösung 5% (sulfatfrei): zum Gebrauch leicht erwärmen. 4. Bariumchloridlösung 1%. 5. K_2SO_4-Standardlösung. 0,545 g K_2SO_4 (wasserfrei) werden auf 1000 ccm Wasser gelöst. 1 ccm dieser Lösung enthält 0,1 mg S. 6. Oxydationsgemisch: 25 g Zinknitrat, 25 g Natriumchlorid, 10 g Ammoniumchlorid auf 100 ccm Wasser gelöst.

a) Bestimmung des anorganischen Schwefels. 1 ccm 5fach verdünnter Harn (sehr konzentrierte Harne, ferner Harn von Katzen oder Hunden muß 10fach verdünnt werden) wird mit 15 ccm n/10 HCl, 2 ccm 0,6 n Natronlauge (2) und 1 ccm Gelatinelösung versetzt und vorsichtig durchgemischt (nicht schütteln!). Zu gleicher Zeit wird 1 ccm Standardlösung (mit 0,1 mg S) ebenfalls mit 15 ccm n/10 HCl, 2 ccm Natronlauge und 1 ccm Gelatinelösung versetzt und ebenfalls durch leichtes Hin- und Herneigen gemischt. Zu beiden Proben wird jetzt 5 ccm der Bariumchloridlösung gegeben und vorsichtig durchgemischt. Nach 15 Minuten werden die Trübungen im Nephelometer verglichen.

Die Berechnung erfolgt in üblicher Weise, wobei c_1 = 0,1 mg gesetzt wird. Der S-Gehalt in der angewandten Menge (1 ccm) berechnet sich demnach zu $0,1 \frac{s_1}{s}$ mg, in

[1]) Nach Denis und Reed.

100 ccm Harn (bei einer Verdünnung 1 : 5) zu $50 \cdot \frac{s_1}{s}$ mg. Der Gehalt an Schwefelsäure (H_2SO_4) wird aus dem so gefundenen Wert durch Multiplikation mit 3,06 errechnet.

b) Gemeinsame Bestimmung des anorganischen und des als Ätherschwefelsäure vorhandenen Schwefels (Gesamtsulfate). 1 ccm des wie für die Bestimmung des anorganischen Schwefels verdünnten Harns wird mit 1 ccm n/10 HCl 15—20 Minuten auf freier, kleiner Flamme zum Sieden erhitzt, so daß am Ende ungefähr 1 ccm zurückbleibt. Dieser wird in 15 ccm n/10 HCl gelöst, und in derselben Weise wie oben beschrieben NaOH, Gelatine und Bariumchlorid zugefügt. Auch die Kontrolle wird genau in der oben geschilderten Art zur gleichen Zeit fertiggemacht. Nach 15 Minuten wird im Nephelometer verglichen. Der gefundene Wert ergibt den S der Gesamtsulfate. Aus der Differenz der Werte aus den Bestimmungen a und b ergibt sich die S-Menge der Ätherschwefelsäuren.

Beispiel: Harn 5mal verdünnt. Für die anorganischen Sulfate ergab der nephelometrische Vergleich eine Schichtdicke der Standardlösung (s_1) von 20, der Harnlösung (s) von 26,2. Die Menge des S in 100 ccm ist demnach $50 \cdot \frac{20}{26,2} = 38,2$ mg, die der H_2SO_4 also $38,2 \cdot 3,06 = 116,9$ mg. Für die Gesamtsulfate hat der Vergleich bei der gleichen Schichthöhe der Standardlösung (s_1) (20) für die Versuchslösung s 22 ergeben. Die Menge des S der Gesamtsulfate berechnet sich also zu $50 \cdot \frac{20}{22}$ mg $= 45,5$ mg in 100 ccm, die gesamte H_2SO_4 also zu $45,5 \cdot 3,06 = 139,2$ mg in 100 ccm Harn. Der als Ätherschwefelsäure vorhandene S beträgt also $45,5 - 38,2 = 7,3$ mg in 100 ccm, die entsprechende H_2SO_4-Menge $139,2 - 116,9 = 22,3$ mg in 100 ccm.

c) Bestimmung des Gesamt-Schwefels. 1 ccm wie oben verdünnter Harn wird in einem Jenaer Reagensglas oder einem kleinen Mikro-Kjeldahlkölbchen mit 1 ccm Oxydationsgemisch (6) versetzt, auf freier Flamme

langsam zur Trockne gedampft und weiter erhitzt, bis ein weißer Rückstand resultiert. Dieser wird in 2 ccm $^n/_{10}$ HCl gelöst, 15 ccm destilliertes Wasser und 1 ccm 5%ige Gelatinelösung zugegeben und unter Mischen 5 ccm der Bariumchloridlösung zugefügt. Nach 15 Minuten wird im Nephelometer mit der, wie oben beschrieben, angefertigten Vergleichslösung verglichen.

Man erhält so den gesamten Schwefelgehalt: durch Subtraktion des S der gesamten Sulfate errechnet man, wie S. 26 angegeben, den Gehalt an Neutralschwefel.

Bestimmung des Natriums[1]).

Prinzip: Das Natrium wird nach Veraschung als Uranyl-Zinkverbindung ausgefällt und aus dem Gewicht des Niederschlages die Menge des Natriums errechnet.

Erforderlich: 1. Uranyl-Zinkacetat-Lösung. Lösung A. 10 g Uranylacetat (H_2O) und 6 g Essigsäure 30% werden unter Erwärmen in Wasser gelöst und die Lösung auf 65 g gebracht. Lösung B. 30 g Zinkacetat ($3 H_2O$), 3 g Essigsäure 30% werden unter Erwärmen in Wasser gelöst, auf 65 g gebracht. A und B wird gemischt, 24 Stunden stehen gelassen und ein eventuell gebildeter Niederschlag abfiltriert. Gut haltbar in Jenaer- bzw. Pyrex-Glas. 2. 95%iger Alkohol wird mit Lösung 1 gesättigt. 3. Äther.

Die zu untersuchende Probe darf nicht mehr als 8 mg Na im ccm enthalten.

1 ccm Harn wird in a. a. O. angegebener Weise mit konzentrierter HNO_3 unter Zugabe von Perhydrol (30%iges H_2O_2) verascht, die überschüssige Salpetersäure nach Zugabe von destilliertem Wasser vertrieben und die Lösung auf 1 ccm eingedampft. Hiezu werden — am besten im selben Gefäß — die 10fache Menge des Reagenz, also bei 1 ccm 10 ccm Reagenz (in keinem Falle weniger) zugefügt und nach Mischung 30 Minuten stehen gelassen. Hienach wird unter Saugen der Niederschlag durch ein Jenaer Glasfiltergerät abfiltriert und der Niederschlag 5—10mal mit je 2 ccm der Reagenzlösung (1) ausgewaschen, wobei jedesmal gut abgesaugt werden muß. Sodann

[1]) Nach Barber und Kolthoff. Jl. Am. chem. soc. **50**, 1625 (1928).

wird 5mal mit 2 ccm Alkohol (2) nachgewaschen, schließlich mit Äther durchgesaugt, solange, bis der Äther völlig entfernt ist. Der Tiegel wird dann außen gut abgewischt, in einen Exsikkator überführt und gewogen.

Für die Berechnung ist maßgebend, daß die Formel des gebildeten Niederschlages $(UO_2)_3 Zn Na (CH_3COO)_9 6 H_2O$ ist. Es muß danach das Gewicht des Niederschlages mit 0,01495 multipliziert werden, um die Menge des Natriums in der angewandten Probe zu finden.

Wird das Verfahren für die Untersuchung von Blut angewendet, so geht man ebenfalls von 1 ccm (Blut oder Blutflüssigkeit) aus. Von Organen verwendet man 2—3 g, die in gleicher Weise verascht werden: wenn man die ungefähren Werte für den Na-Gehalt der Organe kennt, kann man die angewandten Mengen entsprechend ändern, wobei immer zu berücksichtigen ist, daß 1 ccm der Aschenflüssigkeit nicht mehr als 8 mg enthalten darf und vom Reagens stets die 10fache Menge der Aschenlösung (keinesfalls weniger als 10 ccm) genommen werden muß.

Kalium, Lithium und Strontium geben in großen Konzentrationen, die jedoch weder bei den anzuwendenden Mengen Harn noch denen von Blut und Organen erreicht werden, ebenfalls Fällung.

Bestimmung des Kaliums.

Prinzip: Kalium wird mit Kobaltnitrit als Kaliumkobaltnitritverbindung gefällt und titrimetrisch bestimmt. Das gleichfalls die Reaktion gebende Ammonium wird vorher entfernt.

Gebrauchte Reagentien: 1. die S. 80 für die Kaliumbestimmung im Blut beschriebene Kobaltnitritlösung. 2. 20 volumen-%ige Schwefelsäure (20 ccm konzentrierte Schwefelsäure + 80 ccm destilliertes Wasser). 3. 1/50 normal Oxalsäurelösung. 4. 1/50 normal Kaliumpermanganatlösung. Diese beiden Lösungen müssen genau stimmen und gegeneinander eingestellt sein, damit umständliche Rechnungen vermieden werden. 5. m-Nitrophenol-Lösung 0,1%.

Der Harn wird mit destilliertem Wasser auf das 10fache verdünnt. 2 ccm der Verdünnung werden in einem Zentrifugenglas mit 1—2 Tropfen n/10 NaOH gegen Lackmus alkalisch gemacht, 3 Minuten in ein siedendes Wasserbad

— zur Entfernung des NH_3 — gestellt[1]) und nach Abkühlung und Zusatz von 2 Tropfen m-Nitrophenollösung bis zum Verschwinden der Gelbfärbung mit n/50 H_2SO_4 versetzt. Dann werden 2 ccm des Kobaltnitritreagenses zugefügt und die Mischung nach Umrühren mit einem feinen Glasstab 2 Stunden lang stehengelassen. Danach wird zentrifugiert; die klare überstehende Lösung wird mit der S. 81 angegebenen Vorrichtung abgehebert oder abgegossen; ungefähr 3 ccm Wasser zugefügt, mit einem feinen Glasstäbchen sehr vorsichtig gemischt und wieder zentrifugiert, nachdem wieder abgegossen und dies so oft wiederholt, bis die überstehende Lösung ganz farblos geworden ist. Man gießt die wasserklare Lösung ab, fügt 1 ccm der 20%igen Schwefelsäure und aus einer Mikrobürette 5 ccm n/50 Kaliumpermanganatlösung zum Rückstand und erwärmt im kochenden Wasserbad 1½ Minuten lang. Ist die rote Farbe des Permanganats dann verschwunden, so wird noch 2 ccm Permanganat, eventuell mehrmals (genau messen), zugefügt und das Erhitzen eine weitere halbe Minute lang fortgesetzt. Wenn nun eine Rötung bestehen blieb, so gibt man unter leichtem Umrühren aus einer anderen Bürette n/50 Oxalsäurelösung zu, bis die Lösung vollständig entfärbt ist. Nunmehr wird mit n/50 Permanganatlösung so lange titriert, bis ein rosafarbener Ton auftritt, der mindestens 1 Minute lang bestehen bleibt. Die Menge der im ganzen verbrauchten ccm n/50 Permanganatlösung (vorher zugegeben + bei der Titration verbrauchte) minus zugegebene Oxalsäurelösung multipliziert mit 71[2]) ergibt die Milligramm Kalium in 100 ccm Harn.

Beispiel: Angewandt 2 ccm Harn 1 : 10; zugesetzt 5 ccm n/50 Permanganatlösung, darauf zugefügt 2 ccm Oxalsäurelösung. Zur Titration bis zur Rotfärbung erforderlich 0,55 ccm Permanganat. 5,0 — 2,0 + 0,55 = 3,55. Diese mal 71 ergeben 252 mg = 0,252 g in 100 ccm Harn oder 0,252%.

[1]) Mit darüber gehaltenem, angefeuchtetem roten Lackmuspapier auf Abwesenheit von NH_3 prüfen, sonst noch weiter erhitzen!
[2]) Diese Zahl ist empirisch gewonnen.

Bestimmung des Calciums.

Prinzip: Das Calcium wird als Calciumoxalat gefällt und die Oxalsäure mit Permanganatlösung titrimetrisch bestimmt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Ammoniumoxalatlösung gesättigt. 2. Ammoniaklösung 10%ig. 3. Essigsäure verdünnt. 4. Kaliumpermanganatlösung $^1/_{100}$ normal. 5. n-Schwefelsäure.

2 ccm Harn (wenn der Harn vorher nicht klar ist, wird mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt, erwärmt, damit ausgefallenes Calciumphosphat gelöst wird, und dann filtriert), werden in ein Zentrifugenglas eingebracht und einige Tropfen Ammoniaklösung zugefügt, bis sich kein stärkerer Niederschlag mehr bildet. Man gibt dann Essigsäure hinzu, bis der Niederschlag gerade verschwunden ist und die Lösung deutlich sauer gegen Lackmuspapier reagiert. Unter leichtem Mischen wird nunmehr 1 ccm der Oxalatlösung (1) zugegeben und $^1/_2$ Stunde stehen gelassen. Es wird jetzt nach Zugabe von ca. 5 ccm Wasser scharf abzentrifugiert, die überstehende klare Lösung (eventuell für Bestimmung von Mg zu verwenden) entfernt, unter leichtem Aufrühren wieder ungefähr 8—10 ccm destilliertes Wasser zugefügt, wieder zentrifugiert und nachdem wieder abgegossen. Das wird so oft wiederholt (2—3mal), bis die überstehende Lösung wasserklar geworden ist und eine Probe des abgegossenen Waschwassers mit einer $CaCl_2$-Lösung keine Trübung mehr gibt (Prüfung auf Oxalsäure, die vollständig entfernt sein muß). Die letzte Waschflüssigkeit wird wieder abgegossen, zum Rückstand 5 ccm Normalschwefelsäure (5) zugegeben und nach Umrühren mit einem Glasstab das Zentrifugenglas in ein Wasserbad von ungefähr 80 Grad eingestellt. Nachdem es dessen Temperatur angenommen hat, wird es herausgenommen und unter Rühren mit n/100 Kaliumpermanganat titriert, bis eine schwache Rotfärbung 1 Minute lang bestehen bleibt.

Die verbrauchten ccm Permanganat multipliziert mit 10 ergeben direkt die mg Calcium in 100 ccm Harn.

Beispiel: Angewandt 2 ccm Harn, zum Titrieren verbraucht 1,61 ccm n/100 Permanganat. 100 ccm Harn enthalten 16,1 mg Ca oder 0,0161%.

Bestimmung des Magnesiums.

Prinzip: In der vom Calcium befreiten Harnlösung wird das Magnesium mit Ammoniumphosphat ausgefällt und der Phosphor der phosphorsauren Ammoniakmagnesia kolorimetrisch bestimmt. Hieraus wird die Menge des Magnesiums berechnet.

Gebrauchte Reagentien: 10%ige Lösung von sekundärem Ammoniumphosphat [$(NH_4)_2HPO_4$]. 2. Ammoniak 25%ig. 3. Ammoniak 10%ig. 4. Ammoniakalkohol: 20 ccm Ammoniak 25% + 80 ccm Alkohol 95%ig. 5. n/10 HCl. 6. Molybdänlösung. 7. Hydrochinonlösung. 8. Carbonat-Sulfitlösung (Herstellung von 6., 7., 8. vgl. bei Bestimmung der Phosphate im Harn S. 20). 9. Phosphat-Standardlösung: 5,605 g trocknes Kaliumphosphat (KH_2PO_4) werden in destilliertem Wasser aufgelöst und die Lösung auf 1 l verdünnt. Von dieser Stammlösung, von der 1 ccm 1 mg Magnesium entspricht, wird eine 100fache Verdünnung hergestellt, indem 10 ccm auf 1000 aufgefüllt werden. Von dieser Lösung entspricht 1 ccm 0,01 mg Magnesium, 10 ccm 0,1 mg Magnesium.

Zur Bestimmung des Magnesiums muß zunächst das Calcium entfernt werden. Die nach Abzentrifugieren des Calciumoxalatniederschlages (S. 31) abgegossene Lösung wird in einem konischen Zentrifugenglas mit 1 ccm der Phosphatlösung (1) und 2 ccm Ammoniak (2) versetzt, mit einem feinen Glasstab die Wandungen des Glases ziemlich stark gerieben und danach das Zentrifugenglas über Nacht stehengelassen. Es scheidet sich in dieser Zeit, wenn durch das genannte Reiben die Bedingungen für die Ausfällung günstig gestaltet worden sind, die Verbindung des Magnesiums mit dem phosphorsauren Ammoniak aus. Man zentrifugiert scharf ab, entfernt die überstehende Flüssigkeit und wäscht den Rückstand unter Zentrifugieren 2mal mit der 10%igen Ammoniaklösung, ein drittes Mal mit der alkoholischen Ammoniaklösung aus. Man gießt die alkoholische Lösung ab, bringt das

Gläschen in ein siedendes Wasserbad und beläßt es dort so lange, bis der Rückstand ganz trocken geworden ist. Man fügt nun 1 ccm n/10 HCl hinzu und läßt ungefähr 2 Stunden bis zur vollständigen Lösung stehen, die man durch leichtes Umrühren mit einem feinen Glasstab beschleunigen kann. Man bringt die Lösung quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in ein Meßkölbchen von 50 ccm Inhalt und füllt zur Marke auf. Man gibt in ein Meßkölbchen von 25 ccm 10 ccm dieser (gut durchmischten) Lösung, in ein zweites gleich großes Meßkölbchen 10 ccm der verdünnten Phosphatstandardlösung entsprechend einem Mg-Gehalt von 0,1 mg. Man gibt in beide Kölbchen je 1 ccm Molybdänlösung, darauf 1 ccm Hydrochinonlösung, mischt leicht um und läßt 5—8 Minuten stehen. Hierauf fügt man in jedes Kölbchen 1 ccm der Carbonat-Sulfitlösung, mischt, füllt mit destilliertem Wasser zur Marke auf und vergleicht im Kolorimeter.

Die Berechnung des Magnesiumgehaltes erfolgt nach der bekannten kolorimetrischen Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wobei c_1 den Mg-Gehalt, welcher der Standardlösung entspricht, also 0,1 mg, s_1 die Schichtdicke der Standardlösung, s die Schichtdicke der Versuchslösung bedeutet. Wenn, wie bei dem hier angegebenen Verfahren 2 ccm Harn zur Bestimmung angewandt worden waren, von denen der 5. Teil, also 0,4 ccm, zum Vergleich gebraucht wurde, berechnet sich der Mg-Gehalt in 100 cm aus der so gefundenen Zahl durch Multiplikation mit 250.

Beispiel: Es wurde die bei der Fällung des Calciums aus 2 ccm Harn resultierende Flüssigkeit weiter verarbeitet und schließlich der 5. Teil zu kolorimetrischer Analyse verwendet. Farbengleichheit im Kolorimeter war erreicht, als die Schichtdicke der 100fach verdünnten Standardlösung 55, die der Versuchslösung (1/5 der ursprünglichen Menge) 50 mm betrug. Die Menge des Mg in den angewandten 0,4 ccm Harn berechnet sich also zu $0{,}10 \cdot \frac{55}{50} = 0{,}11$ mg, also in 100 ccm zu $0{,}11 \cdot 250 = 27{,}5$ mg.

Bestimmung von Ammoniak.

Prinzip: Freimachen des Ammoniaks aus dem Harn durch Zusatz von Alkali, Überdestillieren mit Luftdurchsaugung unter gelinder Erwärmung und Auffangen des Ammoniaks in einer titrierten Schwefelsäurelösung. Titrimetrische Bestimmung.

Erforderlich: 1. n/50 H_2SO_4. 2. n/50 NaOH, zu bereiten aus den vorrätigen n/10 Lösungen durch Verdünnen von 100 ccm auf 500 ccm mit Wasser im Meßkolben. Die Lösungen sind unbeschränkt haltbar, sind jedoch vor dem Gebrauch genau zu prüfen, ob sie einander entsprechen. 3. Indikator: wässerig-alkoholische Lösung von Methylrot, in saurer Lösung rot, in alkalischer gelb. Darstellung: 0,1 g Methylrot werden in 300 ccm 90%igem Alkohol gelöst und 200 ccm destilliertes Wasser zugefügt. 4. Gesättigte Na_2CO_3-Lösung.

Zur Destillation dient folgender einfacher Apparat (Abb. 9). Das große Jenaer oder Pyrex-Reagensglas A ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen armiert, durch dessen eines Loch das bis fast auf den Boden reichende Glasrohr b gesteckt ist, an welches oben ein Trichter angesetzt ist. Durch die andere Öffnung führt ein Glasrohr d, dessen Mündung kurz unter dem Stopfen liegt. Es ist zweimal rechtwinklig umgebogen und besitzt in der Mitte eine kugelförmige Erweiterung, um etwaige Spritzer bei der Destillation unschädlich zu machen. Im gleichen Sinne kann man auch ein Rohr von der Form e gebrauchen, das Spritzer noch sicherer zurückhält. Als Auffangegefäß dienen zwei hintereinander

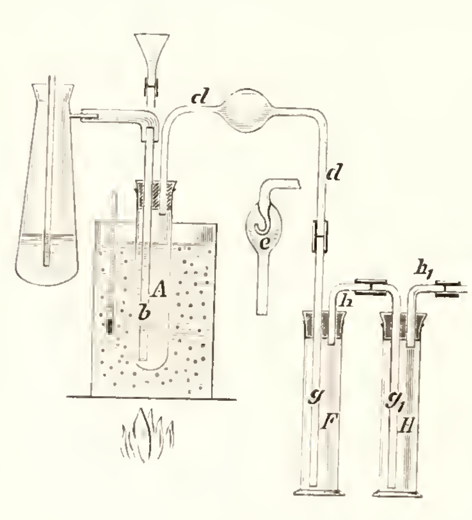


Abb. 9.

geschaltete Standgefäße oder große Reagensgläser F und H, die ebenfalls mit einem doppelt durchbohrten Stopfen armiert sind. Durch die eine Öffnung des Stopfens von F bzw. H wird ein bis auf den Boden reichendes Rohr g bzw. g_1 gesteckt, das mit dem absteigenden Schenkel des Rohres d durch ein gut schließendes Stück Gummischlauch Glas an Glas verbunden ist. Durch die andere Bohrung führt ein rechtwinklig gebogenes Rohr h bzw. h_1, an welches bei F der Verbindungsschlauch zu H, bei H ein zur Wasserluftpumpe führender Schlauch aufgesetzt ist. Das Reagensglas A taucht in ein Becherglas oder ein Blechgefäß mit Wasser ein, das durch eine kleine Flamme auf 45 Grad erwärmt wird.

Da kaum ein chemischer Arbeitsraum ganz frei von Ammoniakdämpfen ist, muß eine Vorrichtung benutzt werden, welche die NH_3-Dämpfe der Luft absorbiert. Hiezu dient eine einfache Waschflasche (Abb. 9), die mit verdünnter Schwefelsäure gefüllt ist und so das Ammoniak zurückhält. Sobald (s. u.) die Natriumcarbonatlösung durch den Trichter eingefüllt ist, wird dieser entfernt und dafür die Sicherheitsvorrichtung angebracht. Die Luft passiert dann erst die Schwefelsäurelösung, bevor sie in den eigentlichen Apparat gelangt.

Zur Bestimmung des Ammoniaks wird in das Aufnahmegefäß F 5 ccm n/50 Schwefelsäure und 2—3 ccm destilliertes Wasser eingefüllt, in das Gefäß H 2 ccm H_2SO_4 + ca. 5 ccm Wasser. Das Reagensglas A wird mit Hilfe einer Vollpipette mit 1 bis 2 ccm Harn (je nach der Menge des zu erwartenden Ammoniaks) beschickt.

Der Harn muß ganz frisch sein, da in altem Harn sich leicht Ammoniak aus anderen Substanzen bildet. Ist es nicht möglich, den Harn sofort zu verwenden, so muß derselbe konserviert werden, was durch leichte Ansäuerung mit Schwefelsäure und Aufbewahrung in gut verkorkten Flaschen im Eisschrank geschieht.

Man fügt zu dem Harn im Reagensglas ca. 5 ccm Wasser (zuviel Flüssigkeit ist zu vermeiden, da das Ammoniak um so besser ausgetrieben wird, je geringer die Flüssigkeitsmenge ist), ferner einen Tropfen einer 1%igen alkoholischen Phenolphthaleinlösung (um zu sehen, ob die später zuzusetzende Menge Alkali genügt hat, um eine alkalische Reaktion zu erzeugen), ferner einige Tropfen Oktylalkohol

oder Caprylalkohol, um das Schäumen der Lösung bei der Destillation und Luftdurchsaugung zu verhindern. Man stellt den Apparat entsprechend der Skizze zusammen, wobei man darauf achten muß, daß die Stopfen gut schließen, die Röhren fest in den Stopfen sitzen, die Verbindungen fest sind und endlich die Röhren b, g, g_1 möglichst tief in die Flüssigkeit in den betreffenden Gefäßen eintauchen. Man läßt durch Öffnen des Wasserhahns an der Luftpumpe einen ganz schwachen Luftstrom durchgehen und gießt sofort durch den Trichter c ungefähr 0,5 ccm der Natriumcarbonatlösung ein (war der Harn angesäuert, statt dieser konzentrierte Natronlauge) und spült mit einigen Tropfen Wasser nach. Die Lösung muß nun alkalisch, also rotgefärbt sein. Jetzt nimmt man den Trichter ab und setzt dafür die Sicherheitsvorrichtung an. Man erwärmt das Wasserbad bis 45 Grad und saugt stärker, darauf achtend, daß kein Spritzen der Flüssigkeit eintritt. Nach einer Destillationsdauer von 20 Minuten stellt man die Pumpe ab, löst die Verbindung zwischen d und g und nimmt die Stopfen von F und H ab, indem man das Rohr g bzw. g_1 mit einigen Tropfen Wasser von innen und außen abspült. Zu den zusammengegossenen Flüssigkeiten aus F und H gibt man 2—3 Tropfen der Methylrotlösung — größere Mengen lassen den Umschlag weniger deutlich erscheinen, doch ist das individuell verschieden — und titriert aus einer in $^1/_{20}$ ccm geteilten Bürette oder besser aus einer Mikrobürette mit $^1/_{50}$ n-Natronlauge bis zum scharfen Umschlag in gelb. Hat man übertitriert, kann nach der gewöhnlichen Regel der Maßanalyse wieder eine bestimmte Menge n/50 Schwefelsäure zugefügt und dann wiederum bis zum Umschlag in gelb titriert werden. Zur Titration stellt man das Gefäß auf eine weiße Platte oder ein Stück weißes Papier, weil so der Umschlag deutlicher erkennbar ist.

Berechnung: 1 ccm n/50 Schwefelsäure entspricht 0,34 mg Ammoniak. Wurden z. B. 5 ccm n/50 Schwefelsäure in dem Gefäß F und 2 ccm in H vorgelegt und wurden zur Titration 5,5 ccm n/50 NaOH verbraucht, so beträgt die Menge Ammoniak, welche aus dem Harn freigemacht und in der Schwefelsäure aufgefangen wurde, 7,0 — 5,5

$1{,}5 \cdot 0{,}34$ mg NH_3 = $0{,}51$ mg NH_3 in der zum Versuch angewandten Harnmenge. Die Menge in 100 ccm ergibt sich hieraus durch entsprechende Multiplikation.

Die Methode gibt genaue Werte, welche denen mit größeren Mengen durchaus ebenbürtig sind. Ohne Erwärmung gelingt eine vollständige Austreibung des Ammoniaks nur in sehr langer Zeit; anderseits darf die Temperatur nicht höher als 50 Grad sein, da sonst eine Bildung von Ammoniak aus anderen Substanzen, besonders Harnstoff, erfolgen kann. Eine Kühlung ist nicht notwendig.

Bestimmung des Harnstoffes.

a) Gemeinsame Bestimmung von Harnstoff und von Ammoniak mit der Ureasemethode.

Prinzip: Harnstoff wird durch Urease in Ammoniak übergeführt und das gebildete Ammoniak zusammen mit dem präformierten durch Titration bestimmt.

Erforderlich die für die Ammoniakbestimmung nötigen Reagentien, ferner eine Phosphatlösung: 83,5 g sekundäres Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 + 12\ H_2O$) und 13,6 g primäres Kaliumphosphat (KH_2PO_4) werden zusammen zu 1000 ccm in Wasser gelöst.

Ureaseferment. Zur Darstellung wird nach Jacoby feines Sojamehl in eine große Porzellannutsche eingeschüttet, deren unterer Ablauf durch einen Schlauch mit Quetschhahn verschlossen ist. Man übergießt das feine Mehl mit Petroläther, den man eine Stunde darauf läßt, läßt dann den Petroläther, der einen Teil des Fettes aus dem Mehl aufgenommen hat, ab, schließt den Quetschhahn wieder, gießt neuen Äther darauf und wiederholt diese Behandlung noch weitere vier Mal. Das auf diese Art entfettete Sojamehl wird auf Glasplatten ausgebreitet und über Nacht trocknen gelassen. Der Petroläther kann durch Abdestillieren aus der fetthaltigen Lösung wiedergewonnen werden. Das entfettete getrocknete Mehl wird mit der 5fachen Menge Wasser in einer gut schließenden Flasche übergossen und 16 bis 24 Stunden nach gutem Umschütteln — zweckmäßig ist im Anfang ungefähr 1stündiges Durchschütteln im Schüttelapparat — im Eisschrank aufbewahrt. Die oben stehende milchige Flüssigkeit wird durch ein gewöhnliches Filter abgegossen oder noch besser abzentrifugiert. Man trocknet sie sodann in Glasschalen mit flachem Boden durch Überleiten von Luft bei 30 bis 40 Grad, z. B. im Faustschen Apparat. Es bleibt eine hornartige Masse zurück, die abgekratzt, zu feinem Pulver verrieben im Exsikkator getrocknet und in einer gut verschlossenen Glasstöpselflasche aufbewahrt wird. Das so gewonnene Ferment ist außerordentlich aktiv. Noch fermentreicher als Sojabohnenmehl ist nach Folin das Mehl der Jackbohne (Canavalia ensiformis). — Im Handel

sind verschiedene Ureasepräparate erhältlich. Man prüft ihre Wirksamkeit am besten durch einen Versuch mit einer Harnstofflösung bekannten Gehaltes.

Zur Bestimmung des Harnstoffs nach der Mikromethode ist der Harn zu konzentriert: man verdünnt auf das 10fache (5 ccm Harn auf 50 ccm im Meßkolben aufgefüllt und gut gemischt) und nimmt von dieser Verdünnung 1 ccm entsprechend 0,1 ccm Harn. Zum Zweck der Konservierung angesäuerter Harn ist im Meßkolben vor dem Auffüllen zu neutralisieren. Auf den Boden des Gefäßes A (Abb. 9) bringt man eine Messerspitze (ca. 50 mg) Ureasepräparat, gibt dazu 1 ccm Phosphatlösung, mit einer Vollpipette 1 ccm des verdünnten Harns und fügt noch ca. 1 ccm destilliertes Wasser hinzu. Da schon geringe Metallspuren die Ureasewirkung verhindern, müssen Gefäße benutzt werden, welche von diesen (z. B. Kupfersulfat) ganz frei sind. Waren vorher in dem Gefäß Metallverbindungen, so muß peinlichst mit Säure gereinigt und nachher sehr gut nachgespült werden. Man schließt das Reagensglas mit einem Stopfen oder einem Wattebausch und läßt die Mischung 30 Minuten in einem Wasserbad oder einem Wärmeschrank von 50 bis höchstens 55 Grad stehen. Nach dieser Zeit ist der gesamte Harnstoff in Ammoniak verwandelt: die Destillation erfolgt genau, wie beim Ammoniak beschrieben worden ist, nach Alkalisierung unter Luftdurchsaugung, doch ist es nicht nötig, die Temperatur auf 45 Grad zu belassen: man kann ohne Schaden auf 60 Grad steigern: höhere Temperaturen sind bei dem Fehlen einer Kühlung des Apparates nicht zweckmäßig. Zur Verhinderung des bei dieser Temperatur sehr starken Schäumens gibt man einige Tropfen Oktylalkohol zu. Als Auffangeflüssigkeit werden ebenfalls 5 ccm n/50 Schwefelsäure in das Gefäß F und 2 ccm in Gefäß H eingefüllt. Die Titration wird gleichfalls mit Methylrot als Indikator ausgeführt.

Berechnung: 1 ccm für die Absorption des Ammoniaks verbrauchte n/50 Schwefelsäure entspricht 0,28 mg Stickstoff. Durch Multiplikation der Differenz zwischen vorgelegter Schwefelsäure und zum Zurücktitrieren verbrauchter Natronlauge mit 0,28 erhält man den gesamten

Ammoniakstickstoff (präformiertes Ammoniak und Ammoniak aus Harnstoff) aus der angewandten Harnmenge. Die Menge des aus Harnstoff gebildeten Stickstoffs erhält man, wenn man von dem mit dieser Methode gefundenen Stickstoff die Menge des Stickstoffs des präformierten Ammoniaks abzieht. Beispiel: Wurden 7 ccm n/50 Schwefelsäure vorgelegt, 5 ccm Natronlauge zum Zurücktitrieren verbraucht, so ist die gesamte Stickstoffmenge aus Ammoniak und Harnstoff in den angewandten 0,1 ccm Harn $2{,}0 \cdot 0{,}28 = 0{,}56$ mg N. 1 ccm Harn enthielt demnach 5,6 mg N, 100 ccm 0,560 g N aus Harnstoff und Ammoniak. Will man den Harnstoff-Stickstoff für sich haben, so muß man von dieser Zahl den Ammoniak-N abziehen. Nimmt man die Verhältnisse in dem für die Ammoniakbestimmung gegebenen Beispiele an, so waren hier 0,51 mg NH_3 bzw. 0,42 mg NH_3-N in 1 ccm Harn, also 0,042 g NH_3-N in 100 ccm enthalten. Durch Subtraktion erhält man $0{,}560 - 0{,}042 = 0{,}518$ g Harnstoff-N in 100 ccm Harn. Da im Molekül des Harnstoffs (60) 28 Teile N enthalten sind, erhält man aus der Harnstoff-N-Zahl die Menge des Harnstoffes durch Multiplikation mit $\frac{60}{28}$ oder mit 2,143. In dem Beispiele wäre also der Harnstoffgehalt $0{,}518 \cdot 2{,}143 = 1{,}110$ g in 100 ccm Harn.

Da die angewandten Reagentien, insbesondere das Sojabohnenmehl, bzw. die Urease, häufig etwas Ammoniak enthalten, ist mit den angewandten Materialien, wie in der Einleitung bereits angegeben, ein Leerversuch anzustellen und dessen Ergebnis bei der Analysenberechnung zu berücksichtigen.

b) Bestimmung von Harnstoff allein mit der Ureasemethode.

Will man nur den Harnstoff allein, nicht zugleich mit dem Ammoniak bestimmen, so kann man aus dem 10fach verdünnten Harn das Ammoniak entfernen und erhält dann in der NH_3-freien Lösung durch Behandlung mit Urease nur das aus Harnstoff stammende Ammoniak. Zu diesem Zweck bringt man in ein Reagensglas ca. 2 g fein gepulverten Permutit, gießt darauf 10—15 ccm des

bereits auf das Zehnfache verdünnten Harns und schüttelt ca. 5 Minuten gut durch, wobei das präformierte Ammoniak vollständig vom Permutit absorbiert wird. Man filtriert und verfährt mit 1 ccm Filtrat genau wie oben angegeben.

Berechnung: 1 ccm verbrauchte n/50 H_2SO_4 entspricht 0,28 mg Harnstoff-N bzw. 0,60 mg Harnstoff. Wurden 7 ccm n/50 H_2SO_4 vorgelegt, 5,5 ccm n/50 NaOH zum Zurücktitrieren verbraucht, so ist der Gehalt an Harnstoff-N in 0,1 ccm $= 1{,}5 \cdot 0{,}28$ mg $= 0{,}42$ mg, der Gehalt an Harnstoff $1{,}5 \cdot 0{,}6 = 0{,}90$ mg, der Prozentgehalt also 0,42 bzw. 0,90%.

c) Bestimmung des Harnstoffs nach der Xanthydrolmethode[1]).

Prinzip: Durch Zusatz einer methylalkoholischen Lösung von Xanthydrol in stark essigsaurer Lösung bildet sich Dixanthylharnstoff. Durch Bestimmung des Stickstoffgehaltes in diesem Komplex errechnet sich die Menge des Harnstoffes.

Nötige Reagentien: 1. 10%ige Lösung von Xanthydrol[2]) in Methylalkohol. 2. Eisessig. 3. Die zur Mikrobestimmung des Stickstoffes nötigen Reagentien (vgl. S. 42).

In ein Zentrifugenglas (Jena oder Pyrex) von ca. 15 ccm Inhalt werden 1 ccm einer Harnverdünnung 1 : 10 eingebracht, dazu 3 ccm Eisessig gegeben, 1 ccm Xanthydrollösung zugefügt und leicht gemischt. Nach je 10 Minuten wird noch zweimal je 1 ccm Xanthydrollösung zugegeben (ebenfalls unter Mischen mit einem dünnen Glasstab) und das letztemal 1 Stunde stehengelassen. Nach dieser Zeit wird der Niederschlag abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und ungefähr 10 ccm Methylalkohol zugefügt. Der Niederschlag wird aufgerührt, wieder zentrifugiert und die Flüssigkeit ebenfalls abgegossen. Der Rest des Methylalkohols wird auf einem elektrischen Sandbad verjagt und nun der Rückstand verascht. Zu diesem Zwecke werden zum Rückstand 5 Tropfen konzen-

[1]) Prinzip von Fosse.

[2]) Festes Xanthydrol muß gegen Licht geschützt aufbewahrt werden. Nicht einwandfreies Xanthydrol löst sich schlecht.

trierte H_2SO_4, 2 Tropfen 20%ige $CuSO_4$-Lösung und einige Tropfen Perhydrol zugegeben und nun das Zentrifugenglas in ein Sandbad eingesteckt, das auf 160—170 Grad erhitzt wird. Nachdem zunächst Schwärzung des Inhaltes eingetreten ist, wird wieder ca. 1 ccm Perhydrol zugefügt, und weiter verascht. Die Zugabe von Perhydrol wird so oft (meist zweimal) fortgesetzt, bis der Inhalt des Zentrifugenglases ganz hell geworden ist. Man läßt dann erkalten und gibt zum Rückstand ca. 3 ccm Wasser.

Die Destillation des N erfolgt aus demselben Zentrifugenglas in dem in Abb. 10 skizzierten Apparat, der im übrigen ganz dem für die Mikro-N-Destillation entspricht[1]).

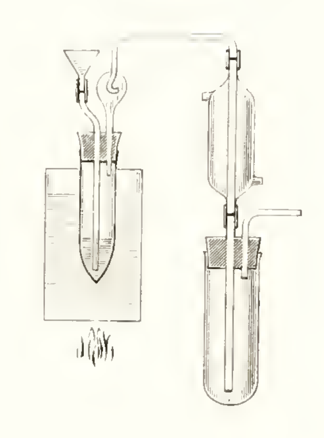


Abb. 10.

Nachdem die Apparatur zusammengesetzt ist, gibt man durch den kleinen Trichter 1 ccm 33%ige Natronlauge und destilliert bei einer Temperatur des Wasserbades von 80 bis 90 Grad 15 Minuten lang, wobei selbstverständlich darauf zu achten ist, daß nichts überspritzt. Die Vorlagen beschickt man im allgemeinen mit 5 ccm und 2 ccm n/50 Schwefelsäure — bei zu erwartendem sehr hohem Harnstoffgehalt entsprechend mehr — und titriert wie üblich mit n/50 NaOH gegen Methylrot zurück.

Berechnung: Vorgelegte H_2SO_4 — zum Zurücktitrieren verbrauchte NaOH multipliziert mit 0,28 gibt die Gramme Harnstoff-Stickstoff in 100 ccm Harn; Multiplikation der Differenz mit 0,60 gibt die Gramme Harnstoff in 100 ccm.

Bestimmung des Gesamtstickstoffes.

Mikrokjeldahlverfahren.

Die Apparatur hiefür ist prinzipiell die gleiche wie die für die Ammoniakbestimmung beschriebene (S. 34). Jedoch ersetzt man das Gefäß A durch einen Mikrokjeldahl-

[1]) Auch hier empfiehlt sich der Vorsatz einer Waschflasche mit H_2SO_4 zum Abfangen von NH_3 (vgl. S. 35).

kolben von ca. 75 ccm Inhalt, benutzt auf jeden Fall einen Kjeldahlaufsatz, wie im Rohr e, und schaltet vor dem Auffangegefäß einen kurzen Kühler ein. Die Apparatur gewinnt dann das in beifolgender Abb. 11 angegebene Aussehen, das ohne weiteres verständlich ist. Bei nicht völliger NH_3-Freiheit des Arbeitsraumes bringt man bei der Destillation an Stelle des Trichters eine mit H_2SO_4 gefüllte Waschflasche an (vgl. S. 35).

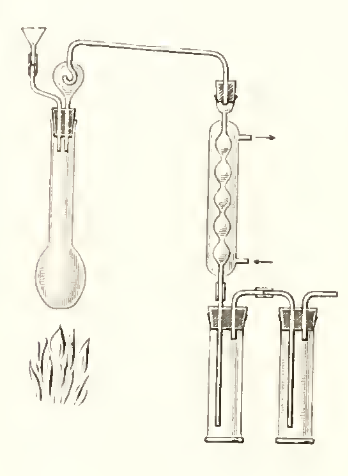


Abb. 11.

Prinzip: Sämtlicher Stickstoff aus Eiweiß, Eiweißabbauproduktion und sonstigen organischen Stickstoffverbindungen (nicht aber von Säureverbindungen des Stickstoffs, wie Salpetersäure[1]) usw.!) wird durch Veraschen mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysators (Cu-Salz) in Ammoniak umgewandelt, welches von der überschüssigen Schwefelsäure als Ammoniumsulfat gebunden wird. Durch Zugabe einer hinreichenden Menge Alkali wird das Ammoniak in Freiheit gesetzt und in eine titrierte Schwefelsäure hereindestilliert. Durch Titration wird die Menge des übergegangenen Ammoniaks und daraus die Menge des Stickstoffs ermittelt.

Notwendige Reagentien: Konzentrierte Schwefelsäure, möglichst NH_3-frei, Kupfersulfatlösung 10%ig, Natronlauge, möglichst ammoniakfrei, 33%ig: zur Titration die bei der Ammoniakbestimmung angegebenen Reagentien.

Der Harn wird wie bei der Harnstoffbestimmung auf das 10fache verdünnt. 1 ccm der verdünnten Lösung wird mit einer Vollpipette in den Mikrokjeldahlkolben einpipettiert, hiezu 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure —

[1]) Will man auch diese bestimmen, so muß eine Vorbehandlung eintreten. Vgl. dazu Elek und Sobotka, Jl. of the Amer. chem. Soc. 1926, Nr. 2, S. 503.

am besten aus einer Tropfflasche: 1 ccm ungefähr = 30 Tropfen — und 4—6 Tropfen Kupfersulfatlösung gegeben und die Mischung auf freier Flamme so lange erhitzt, bis die durch Bildung von Kohle anfänglich braune Färbung in eine hellgrüne bis weißliche übergegangen ist. Es ist zu vermeiden, unnötig längere Zeit bis zum Festwerden zu erhitzen, da unter diesen Umständen Ammoniak entweichen kann. Nach fertiger Veraschung läßt man abkühlen und verdünnt mit 20—25 ccm destilliertem Wasser, wobei die Färbung bläulich klar sein muß. Die Veraschung kann, wenn ein Abzug nicht zur Verfügung ist, auch in einem offenen Raume vorgenommen werden, wenn man dafür sorgt, daß die Schwefelsäuredämpfe unschädlich gemacht werden. Man kann dies erreichen, wenn man auf den Hals des Kjeldahlkolbens einen Aufsatz aufsetzt, dessen anderes Ende in eine Waschflasche mit Wasser taucht, während ein zweiter Weg aus dieser zur Luftpumpe führt, so daß die Dämpfe dauernd abgesaugt werden (s. Abb. 12).

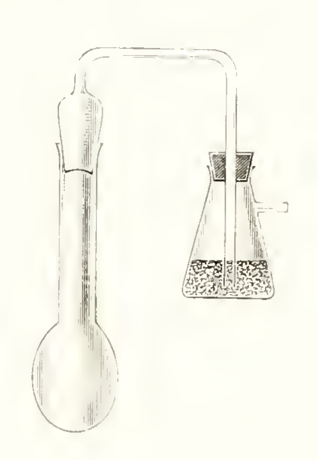


Abb. 12.

Für die Destillation wird das Auffangegefäß mit 5 ccm n/50 Schwefelsäure beschickt, wenn nötig etwas Wasser zugegeben, so daß das vom Kühler kommende Rohr gut in die Flüssigkeit eintaucht. Nachdem der Apparat zusammengesetzt, die Wasserkühlung angestellt ist und alle Verbindungen auf ihre Dichtheit geprüft sind, saugt man wie bei der Ammoniakbestimmung einen schwachen Luftstrom durch den Apparat, gießt sodann durch den Trichter 4 ccm Natronlauge ein, setzt, wenn nötig, jetzt die Sicherheitswaschflasche vor und steckt die Flamme unter dem Destillierkolben an. Auf Zusatz der Lauge muß die Flüssigkeit im Destillierkolben infolge Bildung von Kupferhydroxyd eine bläuliche Trübung geben; ist dies nicht der Fall, so ist noch etwas Lauge nachzugeben. Man verstärkt die Luftdurchsaugung und

regelt die Flamme so, daß die Flüssigkeit (ein Wasserbad wird hier nicht angewendet) in regelmäßigem deutlichen Sieden bleibt: durch Ausscheiden von Kupferoxyd tritt in der Regel bald eine Schwarzfärbung ein. Man destilliert hier im ganzen 15 Minuten, in welcher Zeit sämtliches Ammoniak übergetrieben ist, achtet aber darauf, daß immer im Destillierkolben so viel Flüssigkeit bleibt, daß das Trichterrohr noch eintaucht.

Nach Beendigung der Destillation verfährt man genau so, wie bei der Ammoniakbestimmung angegeben ist. Die durch Schwefelsäure gebundene Menge Ammoniak wird in üblicher Weise ermittelt; durch Multiplikation der Differenz zwischen der angewandten n/50 Schwefelsäure und der zum Zurücktitrieren verbrauchten n/50 Natronlauge mit 0,28 erhält man die mg N in den angewandten 0,1 ccm Harn bzw. die Anzahl g N in 100 ccm Harn.

Es muß nochmals wiederholt werden, daß regelmäßig Leerbestimmungen auszuführen sind, bei welchen man in ganz der gleichen Weise verfährt wie bei den Vollbestimmungen, mit der einzigen Ausnahme, daß man die betreffende Menge Harn durch eine entsprechende Menge destilliertes Wasser ersetzt. Alle Versuchsbedingungen sind bei diesen Kontrollen, die mindestens so oft anzustellen sind, als neue Reagentien angebrochen werden, innezuhalten und der hiebei ermittelte Ammoniakgehalt der Reagentien bei der Ausrechnung in Abzug zu bringen.

Beispiel: Angewandt 0,1 ccm Harn. Vorgelegt 7 ccm n/50 H_2SO_4, zum Zurücktitrieren gebraucht 2,5 ccm. $7 - 2,5 = 4,5 \times 0,28 = 1,26$ mg N bzw. 1,26 g%.

Bestimmung des Gesamtstickstoffes durch direkte Neßlerisation[1]).

Prinzip: Feuchte Verbrennung mit Schwefelsäure und H_2O_2 und direkte Neßlerisation der erhaltenen Aschenlösung.

Erforderlich: 1. Schwefelsäure-Lösung; Mischung von genau 1 Volumen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Volumen destilliertem Wasser. 2. 30% iges H_2O_2 (Perhydrol

[1]) Nach Koch und McMeekin.

oder Superoxol). Kühl aufzubewahren! 3. Neßlers Reagens. 25 g Jod werden in 20 ccm Wasser aufgelöst, das 30 g Kaliumjodid enthält. Nach vollständiger Lösung werden 30 g reines metallisches Quecksilber zugefügt und gut geschüttelt, wobei das Gefäß zur Vermeidung starker Erhitzung von Zeit zu Zeit unter fließendes kaltes Wasser zu halten ist. Nachdem die überstehende Flüssigkeit die gelbe Jodfarbe vollständig verloren hat, wird sie abdekantiert und mit Stärkelösung auf freies Jod geprüft. Ist dieses nicht mehr vorhanden, werden zu der gesamten Lösung noch einige Tropfen der oben angegebenen Jodlösung zugegeben, bis eine schwache Jodreaktion (Prüfung einiger Tropfen mit Stärkelösung) erscheint. Man verdünnt dann auf 200 ccm und mischt gut durch. Anderseits werden 975 ccm einer genau 10%igen NaOH-Lösung hergestellt und hiezu die Kaliumquecksilberjodid-Lösung zugegeben. Es wird gut durchgemischt und bis zur vollständigen Klärung stehen gelassen. 4. Standard-Ammoniumsulfat-Lösung. 0,944 g Ammoniumsulfat werden in 0,05 n-Schwefelsäure gelöst und mit derselben Schwefelsäure auf 1000 aufgefüllt. 5 ccm dieser Lösung entsprechen 1 mg N. 5. Gummigutti-Lösung. In einen Liter-Meßzylinder wird destilliertes kaltes Wasser eingefüllt und direkt unter der Oberfläche ein feines Drahtnetz eingehängt, das 20 g löslichen Gummigutti enthält. Man läßt 24 Stunden stehen, nimmt das Drahtnetz heraus und filtriert die Flüssigkeit durch ein nicht zu feines Filter oder ein sauberes Tuch.

Harn wird im allgemeinen auf das 10fache, bei zu erwartendem größeren N-Gehalt auf das 20fache verdünnt. 1 ccm werden in ein großes (20 × 2,5 cm) Jenaer oder Pyrex-Reagensglas abgemessen, 1 ccm der Schwefelsäure (1) zugegeben und auf freier Flamme oder im Sandbad unter gelegentlichem Hin- und Herbewegen bis zur Entfernung des Wassers erhitzt. Eine eingebrachte kleine Glaskugel verhindert eventuelles Stoßen. Es wird dann über einen Mikrobrenner bis zum Erscheinen weißer Schwefelsäuredämpfe, nicht länger, erhitzt. Man läßt kurz abkühlen, gibt einen Tropfen H_2O_2-Lösung so zu, daß er direkt in die Flüssigkeit hereinfällt und erhitzt nochmals langsam

einige Minuten, wobei die anfänglich dunkel gefärbte Lösung ganz farblos werden muß. Ist das nicht erreicht, wird nochmals ein Tropfen zugegeben und das Erhitzen wiederholt.

Nach Abkühlung wird unter Nachspülen der Inhalt in einen 100 ccm Meßkolben überführt und ungefähr bis zu 75 ccm verdünnt. Dazu kommt 1 ccm Gummigutti-Lösung und nach Umschütteln 15 ccm Neßlers Reagens; wiederum umschütteln, bis zur Marke auffüllen und nochmals mischen. In einen anderen 100 ccm-Meßkolben kommen, je nach der erwarteten N-Menge, 2—5 ccm der Standard-Lösung (2 ccm = 0,4 mg N, 5 ccm = 1 mg N), ebenfalls 1 ccm der Schwefelsäure (1). Nach Auffüllen auf ca. 75 wird, wie bei der Versuchslösung, zunächst 1 ccm Gummigutti-Lösung, nach Umschütteln 15 ccm Neßlers Reagens zugegeben, zur Marke aufgefüllt und im Kolorimeter verglichen. Die Berechnung ist die übliche: $\frac{s_1}{s} \times$ mg N in der Vergleichs-Lösung = mg N in 1 ccm (der benutzten Menge) des verdünnten Harns.

Bestimmung der Aminosäuren[1]).

Prinzip: Es wird mit Naphthochinonsulfosäure eine Färbung erzeugt, welche kolorimetrisch mit einer solchen verglichen wird, welche eine Aminosäurelösung bekannten Gehaltes ergibt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Lösung von Na-Carbonat krist. 2,5%ig, 2. Glykokoll-Vergleichslösung, enthaltend 0,1 mg N im ccm. Hiezu werden 0,0536 g Glykokoll in 100 ccm n/10 HCl gelöst. Die Lösung hält sich nicht unbeschränkt. Sobald irgendwelche Trübungen in ihr auftreten, ist sie zu erneuern. 3. n/10 HCl. 4. Reagenslösung: 100 mg naphthochinonsulfosaures Natrium[2]) werden in

---

[1]) Nach Folin.

[2]) Zu beziehen von Dr. Th. Schuchardt, Chem. Fabrik, Görlitz. Das Präparat muß folgende Bedinguugen erfüllen:

1. Eine 1%ige Lösung des Präparates in Wasser soll verglichen mit einer 0,5 Normallösung von Kaliumbichromat bei Farbengleichheit eine Schichtdicke von 26 bis 27 gegenüber der des Kaliumbichromats von 20 zeigen.

2. Wenn 2 ccm einer 1%igen Lösung auf 25 ccm verdünnt werden, und dazu 1 ccm 25%ige Essigsäure und 1 ccm 15%ige Thiosulfat-

20 ccm Wasser gelöst. Stets frisch zu bereiten! 5. Permutit, gepulvert. 6. Essigsäureacetatlösung: 100 ccm 50%ige Essigsäure werden mit 100 ccm 5%iger Natriumacetatlösung vermischt. 7. Natriumthiosulfatlösung, 4%ig.

Der Harn wird mit der gleichen Menge Wasser (bei sehr starken Konzentrationen mit der doppelten Menge) verdünnt und 10—15 ccm dieser Verdünnung in einem Reagensglas mit 1—2 g Permutit zur Entfernung des Ammoniaks ungefähr 5 Minuten durchgeschüttelt, absetzen gelassen und klar filtriert. Es werden nunmehr in Röhrchen mit einer Marke bei 25 eine Probe des so behandelten Harnes und eine Kontrollprobe angesetzt, und zwar erfolgt der Ansatz nach folgender Aufstellung.

	Harnprobe	Kontrollprobe
Glykokollösung (2)	—	3 ccm
Harnverdünnung	5 ccm	—
n/10 HCl	1 ,,	—
Natriumcarbonatlösung (1)	1 ,,	3 ccm
Wasser	3 ,,	4 ,,
Chinonreagens (4)	5 ,,	5 ,,

Die Proben werden 18—24 Stunden an einer dunklen Stelle aufbewahrt. Nach dieser Zeit werden sie herausgenommen und in der angegebenen Reihenfolge die nachfolgenden Reagentien zugefügt:

	Zur Harnprobe	Zur Kontrollprobe
Essigsäureacetatlösung (6)	1 ccm	1 ccm
Thiosulfatlösung (7)	5 ,,	5 ,,
Wasser	bis 25 ,,	bis 25 ,,

Es wird gut durchgemischt und der kolorimetrische Vergleich vorgenommen, zweckmäßig unter Anwendung eines Farbglases.

lösung gesetzt werden, soll die Lösung in wenigen Sekunden fast farblos werden.

3. Zur Probe auf Abwesenheit von Ammoniak werden 10 ccm der 1%igen Chinonlösung mit ungefähr 2—3 g Permutit 3 bis 4 Minuten geschüttelt. Man gießt ab und wäscht den Permutit 4—5mal mit destilliertem Wasser aus, bis die Waschflüssigkeit ganz farblos ist. Setzt man nun zum Permutitrückstand einige Tropfen 10%ige Natronlauge, 5 ccm Wasser und 5 ccm Neßlers Reagens, so darf keine Gelbfärbung auftreten.

Die Menge des Aminostickstoffs im Harn berechnet sich nach der bekannten Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wobei c_1 die Menge des Aminostickstoffs in der Kontrolle (0,3 mg), s_1 und s die Kolorimeterablesungen der Kontrollösung bzw. der Harnprobe bedeuten. Diese Zahl ist noch mit der Harnverdünnung zu multiplizieren.

Beispiel: Es sei der Harn auf das Doppelte verdünnt gewesen, die Ablesungen am Kolorimeter seien bei Farbengleichheit für die Kontrollösung $s_1 = 30$, für die Versuchslösung (s) = 20. Da zum Vergleich eine Glykokolllösung mit 0,3 mg N angewandt war, ergibt sich die Konzentration in den angewandten 5 ccm verdünnten Harnes zu $0{,}30 \cdot \frac{30}{20}$ mg = 0,45 mg Amino-N in 5 ccm verdünntem Harn. Da der Harn auf das Doppelte verdünnt war, ist dies der Gehalt von 2,5 ccm unverdünnten Harn. Die Menge von Amino-N in 100 ccm wird also durch Multiplikation mit 40 ermittelt und ergibt sich demnach zu 18 mg Amino-N in 100 ccm des unverdünnten Harns.

Bestimmung des Kohlenstoffes[1]).

Prinzip: Die bei der Verbrennung des Harns oder anderen organischen Materials freiwerdende Kohlensäure wird in KOH-Lösung aufgenommen und das zur Fällung der CO_2 benötigte $Ba^{\cdot\cdot}$ durch Titration bestimmt.

Erforderlich: 1. Kaliumbichromat pro analysi, gepulvert; 2. Silberbichromat. 5 g Kaliumbichromat werden in 75 ccm Wasser gelöst und eine Lösung von 5 g Silbernitrat in 25 ccm Wasser zugegeben. Der gebildete Niederschlag wird auf einer Nutsche abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und bei 110—115 Grad getrocknet. 3. CO_2-freie KOH-Lösung. 150 g KOH in Stangen werden in 1000 ccm Wasser gelöst, anderseits 10 g Ba $(OH)_2$ in 100 ccm kochendem Wasser gelöst und der anderen Lösung zugefügt. Man läßt absetzen und prüft, ob weiterer Zusatz von Baryt noch eine Fällung hervorruft. Ist das nicht der Fall, so wird die

[1]) Nach Osuka. Bioch. Ztschr. **244**, 284 (1932).

klare überstehende Lösung in eine Flasche eingefüllt, welche zur Vermeidung der Kohlensäureaufnahme aus der Luft einen durchbohrten Gummistopfen mit einem Natronkalkrohr trägt. 4. $\frac{N}{20}$ HCl, der auf 1 Liter 3—5 Tropfen Methylrot-Lösung (nach Pregl [6]) zugefügt sind. 5. $\frac{N}{20}$ KOH, die genau gegen die HCl eingestellt sein muß. 6. Methylrot nach Pregl (für [4]) 0,1 g Methylrot wird mit einigen Tropfen n/10-Sodalösung in einem kleinen Mörser verrieben. 7. Natriumsulfat, wasserfrei, reinst. 8. 10%ige Bariumchloridlösung in ausgekochtem Wasser. 9. Konzentrierte H_2SO_4. 10. 100 ccm Wasser (CO_2-frei) + 4 Tropfen 10%-Ammoniak.

Für die Bestimmung wird der von Osuka angegebene Apparat verwendet.

w, x, y, z = Glasrohrteile.
b, s = Glashähne.
B = Kalilaugebirne.
S = Schwefelsäuregefäß.
A = Ausbuchtung am rechtwinkeligen Knick.
L = Luftloch.
r = Großer Schliff.
V = Verengung.
K = Kugel.

Abb. 13.

In die Kugel des Apparates K gibt man 1 ccm Harn (bei abnormen Konzentrationen eine Verdünnung, bzw. mehrere [bis max. 4] ccm) und dazu soviel gepulvertes Natriumsulfat (7), bis die ganze Flüssigkeit aufgenommen ist. Ferner wird zugegeben 0,12—0,14 g Silberchromat (2) und 0,15 g Kaliumbichromat. Die Kugel wird dann in das Gestell eingespannt. In die Birne B tut man dann ungefähr 1 ccm der Kalilauge-Lösung (3) mit einer 1 ccm Pipette, die vorher mit kohlensäurefreiem Wasser durchgespült wurde (nicht ausblasen!). Das Zuführungsrohr n zur Birne B wird wiederholt mit kohlensäurefreiem Wasser nachgespült. Jetzt wird der Aufsatz auf die Kugel gesetzt, nachdem der Schliff r mit Pyrophosphorsäure eingerieben

worden war: er muß sich ganz leicht hin und herdrehen lassen. Der Glashahn s, welcher die Zuleitung zur Schwefelsäure abschließt, wird ebenfalls mit Pyrophosphorsäure geschmiert und eingesetzt. In das Gefäß S kommt dann ca. 1 ccm konzentrierte H_2SO_4. Jetzt wird an das Zuleitungsrohr zur Birne n die Wasserstrahlpumpe angesetzt, man öffnet den mit Vaseline geschmierten Hahn und evakuiert bei gutsaugender Pumpe etwa 2 Minuten lang. Man schließt dann zunächst den zur Birne führenden Hahn b, nimmt den Druckschlauch der Wasserstrahlpumpe ab und gibt in das Rohr n über dem Hahn möglichst schnell CO_2-freies Wasser, damit keine Luft eindringen kann.

Die Kugel des Apparates K wird nun bis etwa zur Hälfte in ein siedendes Wasserbad eingetaucht und 4 Minuten darin belassen, wobei der Inhalt zum Kochen kommt. Man läßt dann die aus dem Wasserbad herausgenommene Kugel etwas abkühlen und gibt dann in den Trichter S zu der schon vorhandenen H_2SO_4 noch ca. 15 ccm hinzu. Darauf läßt man die Hälfte hievon langsam in die Kugel einfließen, schließt den Hahn und erhitzt die Kugel mit der Mikroflamme 15 Minuten lang, wobei Grünfärbung eintreten muß. Schäumt das Reaktionsgemisch zu stark, muß man die Flamme vorübergehend fortnehmen. Ist die Gasentwicklung beendet, was 20—25 Minuten, längstens 30 Minuten dauert, läßt man etwas abkühlen, und nimmt den Apparat auseinander. Hiebei läßt man die noch im Trichter vorhandene H_2SO_4 in die Kugel einfließen, nimmt dann den Apparat aus dem Gestell, nimmt den Aufsatz bei r von der Kugel ab, und spült ihn unten ebenso wie den Glasstopfen der H_2SO_4 gut mit Leitungswasser ab, während das gewundene, von unten seitlich zur Birne führende Rohr mit CO_2-freiem Wasser ausgespült wird. Jetzt wird der Inhalt der Birne in ein genügend großes Zentrifugenglas überführt, die Birne mehrfach mit CO_2-freiem Wasser nachgespült und dieses ebenfalls in das Zentrifugenglas gegeben. Man verschließt dieses mit einem Korken und stellt es in ein siedendes Wasserbad ein. 8 ccm kochende $BaCl_2$-Lösung (8) werden der heißen Lösung zugegeben, man rührt mit einem dünnen Glasstäbchen um, gibt einige Tropfen Alkohol zu, korkt wieder zu, und

zentrifugiert möglichst schnell mit einer schnellaufenden Zentrifuge ca. 2 Minuten, so daß die überstehende Flüssigkeit ganz klar ist. Man gießt die klare Lösung ab und wäscht den Niederschlag unter Aufwirbeln mit einem Glasstab

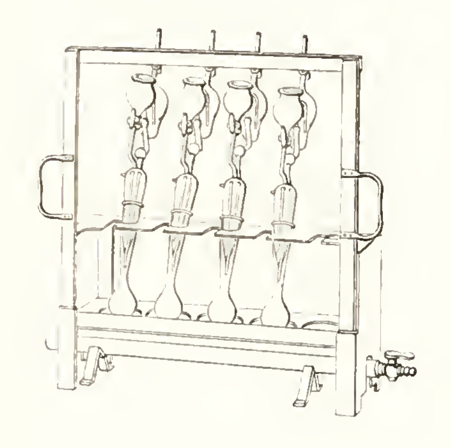


Abb. 14 zeigt vier Apparate, die in dem eigens für diesen Zweck konstruierten Gestell nebeneinander erhitzt werden können. Sie befinden sich in dem Gestell in schräger Lage mit der Kalilaugebirne leicht nach unten geneigt. Zum Schutz für den Experimentierenden befindet sich vor dem Gestell eine herausnehmbare Glasscheibe.

Abb. 14.

mit siedendem CO_2-freiem ammoniakhaltigem Wasser (10) nach und spült den Rand des Glases mit absolutem Alkohol nach. Das Zentrifugieren, Abgießen, Aufwirbeln nach Zugabe neuer Waschflüssigkeit wird nochmals wiederholt und nun 4 Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Abgießen der letzten Waschflüssigkeit werden zu dem Niederschlag 20 ccm der HCl-Lösung (4) zugegeben, der Inhalt mit viel CO_2-freiem destillierten Wasser in einen großen Erlenmeyerkolben überspült und, wenn die rote Farbe verschwinden sollte, weiter aus einer Bürette gemessene Mengen von HCl-Lösung so lange zugegeben, bis der Niederschlag vollständig gelöst ist und die rote Farbe nicht mehr verschwindet. Man titriert dann die Lösung mit Kalilauge (5) bis zum Farbenumschlag (Gelbfärbung).

Berechnung: Die verbrauchten ccm n/20 Salzsäure abzüglich der zum Zurücktitrieren verbrauchten ccm n/20 KOH geben die Menge des Kohlenstoffs. Infolge des Kohlensäuregehaltes der Luft ist in allen Fällen 0,3 von dieser Zahl abzuziehen und die erhaltene Zahl mit 0,3 zu multiplizieren.

Beispiel: Es waren 1 ccm Harn angewandt. Zum Bariumcarbonatniederschlag waren zugegeben 20 ccm n/20 HCl, zur Titration bis zum Umschlag verbraucht 1,5 ccm KOH. Es waren also erforderlich 18,5 ccm Säure. Die Menge des Kohlenstoffs beträgt also, unter Berücksichtigung des oben genannten Fehlers (18,5 — 0,3) multipliziert mit 0,3, d. h. 5,46 mg in 1 ccm, in 1000 ccm Harn also 0,546 g C.

Vom normalen Gang der Bestimmung werden bisweilen Abweichungen beobachtet. 1. Hat man in die Birne beim Nachspülen der KOH zu viel Wasser zugefügt, so daß die Gefahr besteht, daß das gewundene, nach unten führende Zuleitungsrohr in die Flüssigkeit eintaucht, so muß, da dieses in jedem Falle vermieden werden muß, der Apparat schräg gestellt werden. 2. Läuft nach dem Evakuieren die H_2SO_4 nicht in die Kugel herein, oder steigen beim späteren Erhitzen in die H_2SO_4 Blasen auf, so muß die Bestimmung verworfen werden, weil der Apparat nicht genügend luftleer war. 3. Beim Auseinandernehmen des Apparates muß man den Aufsatz etwas drehen und fest anfassen, um ihn leicht los zu bekommen. Die in der Kugel zurückbleibende harte Masse muß möglichst gleich nach dem Auseinandernehmen durch tüchtiges Schwenken entfernt werden, wenn das nicht gelingt, mit wenig Wasser die Kugel bis zur Lösung ausgespült werden. 4. Tritt schon beim Evakuieren in der Kalilauge-Birne Trübung oder gar Niederschlag auf, so ist CO_2 hereingekommen und die Bestimmung muß verworfen werden. Vor jedem Gebrauch muß der Apparat, am besten durch längeres Evakuieren, absolut trocken sein.

Bestimmung der Glukose[1]).

Prinzip: Durch Erhitzen der Harnprobe mit einem Dinitrosalicylsäurereagens wird der Zucker reduziert; die dabei entstehende Farbe wird mit der einer Standardlösung bekannten Gehaltes, welche ebenso behandelt wurde, verglichen.

Erforderlich: 1. Reagenz A. Zu 10 g kristallisiertem Phenol werden 22 ccm 10%ige NaOH zugefügt und mit

---

[1]) Nach Sumner. Jl. of biol. chem. 65, 383 (1925).

Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. 6,9 g Natriumbisulfit werden in 69 ccm der alkalischen Phenollösung gelöst. B. In 10 ccm 1,5%iger NaOH-Lösung werden 255 g Seignette-Salz gelöst und 880 ccm einer 1%igen Lösung von Dinitrosalicylsäure zugefügt. Lösung B wird zu Lösung A gegeben. (Über Herstellung der Dinitrosalicylsäure vgl. Sumner, Journ. biol. Chem., Bd. 47, p. 5, 1921, zu beziehen auch von der Eastman Kodak Comp.). 2. Vergleichslösung: 0,1%ige Traubenzuckerlösung in sterilem Wasser, durch ein Antisepticum wie Thymol steril zu halten, bei Trübung zu verwerfen.

In ein Reagensglas mit einer Marke bei 25 ccm wird 1 ccm Harn (unverdünnt, wenn es sich um die Bestimmung von Spuren in „normalem" Harn handelt, bei Konzentrationen bis 2% 10fach verdünnt, bei höherer Konzentration als 2% auf das 25fache verdünnt) einpipettiert und 3 ccm des Reagens zugegeben. Mischen und 5 Minuten in kochendem Wasser erhitzen, dann in fließendem Wasser abkühlen und auf 25 ccm verdünnen. Zu gleicher Zeit werden 1 ccm Standardlösung ebenfalls mit 3 ccm Reagens versetzt und ebenso wie die Probe behandelt und schließlich auch auf 25 ccm aufgefüllt. Die Färbungen werden im Kolorimeter verglichen. Die Berechnung erfolgt in üblicher Weise. War der Harn 10 mal verdünnt, die Schichthöhe der Vergleichslösung 30, die der Versuchslösung 24 bei Farbengleichheit, so berechnet sich der Prozentgehalt des Harnes an Glukose, da ja 1 ccm der Standardlösung mit 0,1% 1 ccm des (10 mal verdünnten) Harnes mit 1% entsprechen, zu $\frac{30}{24}$ mal 1 = 1,25%.

Wurde der Harn auf das 25fache verdünnt, so ist der Quotient natürlich mit 2,5 zu multiplizieren.

Bestimmung des Acetons, der Acetessigsäure und der β-Oxybuttersäure.

a) Aceton und Acetessigsäure. Aceton (präformiertes) wird in der Kälte, Aceton aus Acetessigsäure in der Wärme unter Säurezusatz mit Hilfe eines Luftstromes ausgetrieben. Als Maß der Acetonmenge dient die Jodoformbildung. Das

nicht zu Jodoformbildung verbrauchte Jod wird mit Thiosulfat titrimetrisch bestimmt.

Notwendige Reagentien: 1. Oxalsäurelösung, 1%ig; 2. Essigsäure, 10%ig; 3. Natronlauge, 15%ig; 4. Salzsäure, konzentriert; 5. $^1/_{100}$ n-Jodlösung; 6. $^1/_{100}$ n-Thiosulfatlösung, letztere beide genau aufeinander eingestellt; 7. 1%ige Stärkelösung.

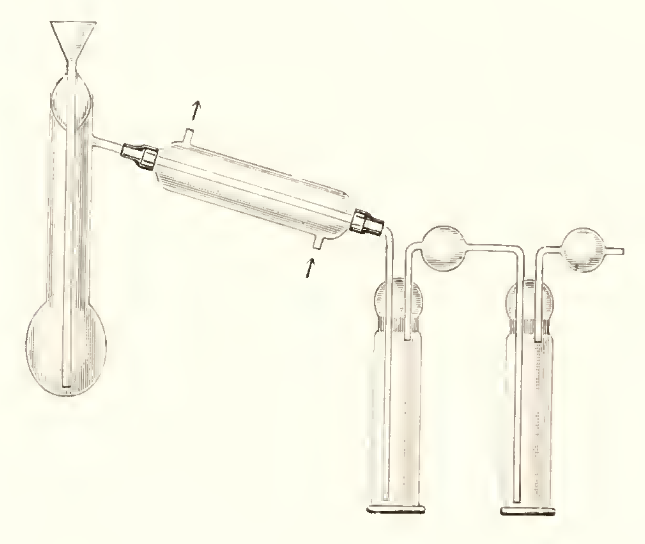


Abb. 15.

Zur Bestimmung wird der in Abb. 15 dargestellte Apparat benutzt. Als Destillierkolben dient ein Fraktionierkölbchen von ca. 125 ccm Inhalt mit langem Hals, der oben einen eingeschliffenen Stopfen mit fast bis zum Boden reichenden, oben zu einem Trichter erweiterten Rohr trägt, als Auffanggefäße zwei sogenannte Gaswaschflaschen mit eingeschliffenem Stopfen, die miteinander so verbunden sind, daß das kurze Rohr der ersten Flasche mit dem langen, eintauchenden Rohr der zweiten Flasche verbunden ist. Verbindungen mit dem zwischengeschalteten Kühler Glas an Glas. Man gibt in das Destilliergefäß 2 ccm Harn, 25 ccm destilliertes Wasser, 2 ccm Oxalsäurelösung und einige Tropfen Vaselinöl, in die erste Vorlage 10 ccm n/100-Jodlösung, 5 ccm Natronlauge und ca. 5 ccm destilliertes Wasser, in die zweite 3 ccm n/100-Jodlösung,

1 ccm Natronlauge und ca. 5 ccm Wasser. Nach beendeter Destillation wird ihr Inhalt sofort zu dem der ersten Vorlage zugefügt, so daß die weitere Verarbeitung gemeinsam erfolgt. Ist sehr viel Aceton zu erwarten, ist die Menge der Jodlösung (stets aus einer Bürette oder mit einer genauen Pipette zu entnehmen!) und der Lauge zu erhöhen.

Ohne zu erwärmen, saugt man während 25 Minuten einen langsamen Luftstrom durch das System. Dann werden die Vorlagen abgenommen, der Inhalt der zweiten Vorlage wird zu dem der ersten gefügt und mit etwas Wasser nachgespült. Die Vorlagen werden jetzt durch neue in gleicher Weise beschickte ersetzt. In das Destilliergefäß gibt man durch den Trichter 1 ccm Essigsäure und saugt nun 15 Minuten lang unter Erhitzen des Destillationsgefäßes auf freier Flamme weiter Luft durch. Verdampftes Wasser wird durch Zugießen von destilliertem Wasser durch den Trichter ersetzt. Der Inhalt der beiden Vorlagen wird ebenfalls zusammengegossen.

Die Vorlagen werden sofort nach ihrer Abnahme weiter verarbeitet. Man gibt so viel konzentrierte Salzsäure hinzu, daß die Lösung sich durch Ausscheidung von Jod bräunlich färbt, was mit dem Eintreten einer sauren Reaktion zusammenfällt. Tritt diese Braunfärbung nicht auf, so war zu wenig Jodlösung vorgelegt und die Bestimmung ist mit einer größeren Menge Jodlösung zu wiederholen. Zu der Mischung der Destillate jeder Bestimmung gibt man einige Tropfen Stärkelösung, titriert aus einer in $^1/_{50}$ ccm geteilten Mikrobürette mit n/100-Thiosulfat, bis die Lösung gerade farblos geworden ist. Da die Reagentien jodbindende Stoffe enthalten können, ist ein Leerversuch anzustellen in genau gleicher Weise wie der Vollversuch, mit der einen Abänderung, daß in den Kolben statt Harn nur Wasser eingefüllt wird; ein eventuell dabei erhaltener Wert ist von dem beim Vollversuch gefundenen in Abzug zu bringen. Wenn die Harnlösung stark schäumen sollte, gibt man etwas Paraffinum liquidum dazu, keinesfalls Oktylalkohol, da dieser auch Jod bindet und so schwere Fehler bedingt.

Berechnung: Die Differenz zwischen der vorgelegten Menge Jodlösung und der zum Zurücktitrieren verbrauchten

Menge Thiosulfatlösung in Kubikzentimeter, multipliziert mit 0,1[1]), ergibt die Milligramme Aceton in der angewandten Harnmenge; die Titration der ersten Vorlagen des präformierten Acetons, die der zweiten des Acetons aus Acetessigsäure. Aus dem Werte des Acetons aus Acetessigsäure kann man die Acetessigsäure selbst durch Multiplikation mit 1,76 berechnen.

Beispiel: Für präformiertes Aceton vorgelegt 13 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 12,2 ccm Thiosulfatlösung; Menge des präformierten Acetons $0{,}8 \cdot 0{,}1 = 0{,}08$ mg in 2 ccm, in 100 ccm also 4,0 mg. Für Acetessigsäure vorgelegt 13 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 8 ccm Thiosulfatlösung; Acetonmenge aus Acetessigsäure also $0{,}1 \cdot 5 = 0{,}5$ mg in 2 ccm, bzw. 25 mg in 100 ccm Harn.

Will man Aceton und Acetessigsäure nicht gesondert bestimmen, so verfährt man sofort, wie zur Bestimmung des Acetons aus Acetessigsäure angegeben, und erhält dann das präformierte und das aus Acetessigsäure gebildete Aceton zusammen. Für die meisten klinischen Zwecke genügt dieses Verfahren.

b) Will man auch die β-Oxybuttersäure — durch Oxydation zu Aceton — bestimmen, so muß der Harn vorbehandelt werden. Man gibt in ein Meßkölbchen von 50 ccm genau 5 ccm Harn, dazu einen Überschuß — es darf auf weiteren Zusatz keine Fällung mehr entstehen — von Bleiessig (im allgemeinen genügen 5 ccm) und 1 ccm konz. NH_3, füllt zur Marke auf, mischt, filtriert und verwendet 20 ccm (= 2 ccm Harn) zur Acetonanalyse in der eben beschriebenen Art. Man säuert mit wenig Essigsäure an. Nach Austreibung des freien und des als Acetessigsäure vorhandenen Acetons, wie vorher beschrieben, läßt man abkühlen, gibt in das Destillationsgefäß so viel Wasser, daß die Menge ca. 30 ccm beträgt, und 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure. Nach Verbindung mit den mit Jod und Natronlauge, wie oben beschrieben, beschickten Vorlagen erhitzt man auf kleiner Flamme unter Luftdurchsaugung zum Sieden und gibt durch den Trichter

[1]) Eigentlich 0,0967.

in Zwischenräumen von 5 Minuten viermal 5 ccm einer 2%igen Kaliumbichromatlösung. Nach 20 Minuten ist die Destillation vollendet, und man verfährt mit Ansäuerung und Titration in der oben beschriebenen Weise.

Die Berechnung des Acetons erfolgt wie geschildert. Zur Feststellung der Menge der β-Oxybuttersäure multipliziert man die Differenz zwischen Jodlösung und Thiosulfat (ccm) mit 0,25[1]) und erhält so die Milligramm Oxybuttersäure in der angewandten Harnmenge.

Bestimmung der Harnsäure in mittleren Harnmengen.

Prinzip: Aus dem vorbehandelten Harn wird die Harnsäure als Ammonurat gefällt und die daraus freigesetzte Harnsäure oxydimetrisch bestimmt.

Notwendige Reagentien: 1. Uranammonsulfatlösung: 500 g Ammonsulfat werden in ungefähr 600 ccm Wasser gelöst und in einen Meßkolben von 1 l eingefüllt. Hiezu wird eine Lösung von 5 g Uranacetat in ca. 100 ccm Wasser und 6 ccm konz. Essigsäure (Eisessig) gefügt und die Mischung mit Wasser auf 1 l aufgefüllt; 2. Ammonsulfatlösung 10%; 3. konzentrierte Schwefelsäure; 4. Ammoniak, 25%ig; 5. Kaliumpermanganatlösung, $^1/_{50}$ normal.

60 ccm Harn werden in einem hohen Zylinder mit 15 ccm Uranreagens (1) versetzt, gut durchgemischt und stehengelassen, bis der Niederschlag sich ziemlich gut abgesetzt hat. Man filtriert dann die klare Lösung durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß. In zwei große Zentrifugengläser von je ca. 30 ccm Fassungsraum pipettiert man je 25 ccm der klaren Lösung herein, gibt 2 ccm Ammoniak dazu, verschließt durch einen Stopfen und läßt mindestens über Nacht stehen, bis das ausgeschiedene Ammonurat sich etwas gesetzt hat. Man zentrifugiert dann scharf und gießt die klare überstehende Lösung ab. Man setzt je 15 bis 20 ccm Ammonsulfatlösung (2) zu und zentrifugiert wieder, so daß der Niederschlag von Ammonurat sich gut am Boden absetzt. Die überstehende Flüssigkeit wird wieder abgegossen, das gleiche Verfahren wiederholt, abgegossen und nun im Rück-

[1]) Empirisch festgestellte Zahl.

stand die Bestimmung vorgenommen. Man gibt zu diesem 15 ccm Wasser und 3 ccm konzentrierte Schwefelsäure, wobei die Flüssigkeit sich auf 60—70 Grad erwärmt. Man titriert sofort mit $^{1}/_{50}$ Normal-Permanganatlösung unter häufigem Umrühren mit einem dünnen Glasstäbchen, bis die gesamte Harnsäure oxydiert ist, was dadurch erkennbar wird, daß der nächste einfallende Tropfen Permanganat der Flüssigkeit eine rosa Färbung erteilt. Verschwindet diese innerhalb 10 Sekunden, so ist noch ein Tropfen nachzugeben, bis die Farbe 10 Sekunden lang bestehen bleibt. In beiden Proben muß das Resultat das gleiche sein und höchstens um einen Teilstrich differieren.

Berechnung: Die Anzahl verbrauchter Kubikzentimeter Permanganatlösung multipliziert mit 1,5 ergibt die Anzahl Milligramm Harnsäure in den angewandten 25 ccm Lösung, bzw. 20 ccm Harn. Durch Multiplikation mit 5 wird die Harnsäuremenge in 100 ccm Harn erhalten: dieser Zahl sind noch 3 mg Harnsäure zuzufügen, da diese in Wasser etwas löslich ist.

Beispiel: Verbraucht seien im Durchschnitt der 2 Proben 3,0 ccm n/50-Permanganatlösung. Die Harnsäure in 100 ccm beträgt demnach $3{,}0 \cdot 1{,}5 \cdot 5 = 22{,}5$ mg + 3 mg = 25,5 mg.

Bestimmung des Kreatinins und Kreatins.

Prinzip: Die durch Zugabe einer alkalischen Pikratlösung erzeugte Rotfärbung wird mit der Färbung einer Bichromatlösung, deren Farbtiefe bekannt ist und einer bekannten Kreatininmenge entspricht, verglichen[1]).

Erforderliche Reagentien: 1. Pikrinsäurelösung 1,2% (gesättigt), 2. Natronlauge, 10%ig, 3. ½ Normal-Kaliumbichromatlösung (Vergleichslösung) (25,54 g Kaliumbichromat werden auf 1 l gelöst).

Zur Kreatininbestimmung können sämtliche Harne verwandt werden. Bei Gegenwart von Aceton und Acetessigsäure ist der Harn zunächst zur Entfernung dieser Körper kurz aufzukochen.

---

[1]) Der Vergleich mit einer Standard-Kreatininlösung (wie für Blut beschrieben) scheint für Harn keinen Vorteil zu bieten.

1 ccm Harn wird in einen 50 ccm Meßkolben pipettiert, mit 1,5 ccm Pikrinsäurelösung und 0,5 ccm Natronlauge versetzt, umgeschüttelt, 5 Minuten stehengelassen, auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt und durchgemischt. Die so erhaltene Färbung wird im Kolorimeter mit der Bichromatlösung verglichen, welche sehr annähernd einem Gehalt von 1 mg Kreatinin in 50 ccm entspricht. Wird gleiche Farbtiefe bei gleicher Schichtdicke der Versuchs- und Vergleichslösung erreicht, so enthalten auch die 50 ccm der Vergleichslösung, bzw. der 1 ccm in dieser enthaltene Harn 1 mg Kreatinin. Ist bei gleicher Farbtiefe die Schichtdicke verschieden, so ist der Kreatiningehalt in

$$1 \text{ ccm Harn} = \frac{\text{Schichtdicke der Bichromatlösung}}{\text{Schichtdicke der Versuchslösung}} \cdot 1 \text{ mg}.$$

Beispiel: Die Schichtdicke der Bichromatlösung sei 20 mm, die der Versuchslösung 25 mm; der untersuchte Harn enthält also $\frac{20}{25} \cdot 1 \text{ mg} = 0{,}8 \text{ mg}$ im ccm, 0,08 g Kreatinin in 100 ccm.

Zur Bestimmung des Gesamtkreatinins, d. h. des präformierten Kreatinins (s. oben) und des Kreatins, muß letzteres in Kreatinin übergeführt werden. Dies geschieht durch Erwärmen von 10 ccm Harn + 5 ccm n-HCl während 3 Stunden im Wasserbad von 80°. Nach dieser Zeit wird die Lösung quantitativ in ein Kölbchen von 20 ccm übergespült, mit n-NaOH neutralisiert und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 2 ccm (entsprechend 1 ccm Harn) zur Analyse verwendet, die genau ausgeführt wird, wie für das Kreatinin beschrieben: es wird also ebenfalls 1,5 ccm Pikrinsäurelösung und 0,5 ccm Natronlauge zugesetzt. Die Berechnung gestaltet sich entsprechend. Die Differenz zwischen dem Werte für das Gesamtkreatinin und dem des präformierten ergibt die Menge des Kreatins, als Kreatinin berechnet. Will man sie als Kreatin ausdrücken, so muß die erhaltene Zahl mit 1,27 multipliziert werden.

Mikromethodik des Blutes.

Allgemeines.

Bei den Methoden zur Bestimmung der Blutbestandteile muß man unterscheiden zwischen Mikromethoden mit wenigen Bluttropfen und solchen, bei welchen zwar nur verhältnismäßig geringe Mengen Blut erforderlich sind — besonders im Vergleich mit den früher benötigten —, die immerhin aber einige Kubikzentimeter erfordern. Die in diesen Fällen nötigen Blutmengen entnimmt man am besten in üblicher Weise aus der Armvene mit Hilfe einer Straußschen Kanüle oder noch besser mit einer Spritze. Will man die Bestimmung im Serum vornehmen, so läßt man das Blut sofort in ein steriles Zentrifugenglas einfließen, läßt gerinnen, löst den Blutkuchen am Rande ab und zentrifugiert darauf. Das muß unter Umständen sehr schnell geschehen, da z. B. die kaliumreichen Blutkörperchen bei längerem Stehen Kalium an das kaliumarme Serum abgeben. Das Absetzen des Blutkuchens vor dem Zentrifugieren wird beschleunigt, wenn man das Glas mit dem Blut für ungefähr ½ Stunde in den Brutschrank stellt. Einstellen in Eis pp führt oft zur Hämolyse! Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß Blut aus verschiedenen Distrikten — z. B. Venen- und Kapillarblut — verschiedene Zusammensetzung haben kann.

Soll die Bestimmung im Vollblut oder im Plasma ausgeführt werden, so muß in der Regel, besonders wenn man die weitere Bearbeitung nicht sofort anschließt, ein gerinnungshemmender Stoff zugefügt werden. Man verwendet im wesentlichen die kalkfällenden Substanzen, wobei naturgemäß darauf zu achten ist, daß sie frei von den zu bestimmenden Stoffen sind. Am besten für die meisten Zwecke eignet sich Kaliumoxalat. Man pulvert es ganz fein und gibt in das absolut trockene Gefäß, welches das Blut aufnehmen soll, 20 mg Kaliumoxalat auf 10 ccm Blut. Da größere Mengen unter Umständen schädlich, kleinere ungenügend zur Gerinnungshemmung sind, ist die Blutmenge gut abzumessen: man entnimmt entweder mit einer graduierten Spritze und spritzt aus dieser schnell

das Blut in das oxalathaltende Gefäß hinein, oder, wenn man direkt in dieses Glas aus der Ader einfließen läßt, markiert man am Gefäß die entsprechende Höhe. Nachdem das Blut zum Kaliumoxalat zugetan ist, schüttelt man wiederholt gut um, bis eine vollständige Mischung stattgefunden hat. Die Methode ist durchaus zuverlässig und hat außerdem den großen Vorteil, daß das Blutvolumen nicht verändert wird, also Umrechnungen irgendwelcher Art erspart werden. Für manche Fälle empfiehlt sich eine Ungerinnbarmachung durch Zusatz von Natriumcitrat. Man stellt sich eine 5%ige Citratlösung her und gibt in das Auffangegefäß 1 ccm auf 9 ccm aufzunehmendes Blut. Gute Mischung ist auch hier erforderlich. Nötig ist natürlich, daß das Mischungsverhältnis ganz strikt innegehalten wird, da dieses zum Schluß für die Berechnung wichtig ist. Endlich kann man auch das Blut ohne Zusatz sofort in ein größeres Volumen destilliertes Wasser oder Enteiweißungsflüssigkeit überführen, wobei unter Hämolyse das verdünnte Blut zunächst flüssig bleibt.

Das Blut soll stets vom nüchternen Patienten entnommen werden.

Die eigentliche Mikromethodik des Blutes arbeitet nur mit einigen Tropfen Kapillarblut. Man kann das Blut entweder mit einer Pipette aus dem sich bildenden Blutstropfen entnehmen oder, nach Bang, sofort beim Austritt auf einem Blättchen saugenden Papieres aufnehmen; aus diesem Blättchen werden die zu bestimmenden Bestandteile durch geeignete Lösungsmittel herausgelöst und in der so erhaltenen Lösung die Analyse ausgeführt. Diese Löschpapierblättchen müssen verschiedene Bedingungen erfüllen: sie müssen scharf geschnitten sein, damit keine kleinen Fasern bei der Behandlung sich loslösen und so das Gewicht verändern oder durch Eingehen in die Untersuchungsflüssigkeit zu Fehlern Veranlassung geben können. Sie müssen eine genügende Saugfähigkeit besitzen, um einige Tropfen schnell vollständig aufzunehmen, und sie müssen endlich frei sein von solchen Substanzen, die im Blut bestimmt werden sollen. Durch die Handlungen können fertig präparierte Blättchen in geeigneter Größe (16 × 26 mm) bezogen werden. Man kann sie selbst her-

stellen, indem man weißes, gut saugendes, starkes Löschpapier in passender Größe schneidet, die Stückchen zur Entfernung von eiweißhaltigen und kohlenhydratähnlichen Substanzen mehrere Male mit ganz schwach angesäuertem Wasser und darauf mit reinem Wasser ein- bis zweimal digeriert und dann an der Luft auf sauberem Papier zum Trocknen ausbreitet. Für Fettbestimmungen ist eine Extraktion mit siedendem Äther oder Petroläther und Alkohol erforderlich. Die Wägung der Blättchen vor und nach der Beschickung mit Blut erfolgt auf einer Torsionswaage oder sonst schnell arbeitenden Waage. Es ist darauf zu achten, daß die Lochstanzung, welche zum Anhängen an das Häkchen der Waage erforderlich ist, ganz scharf ist.

Das Blut kann aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnommen werden. Die betreffende Stelle wird, wenn nötig, mit Wasser und Seife, stets aber mit Alkohol und etwas Äther gereinigt: zweckmäßig ist eine leichte Hyperämisierung durch Abreiben mit einem mit Xylol oder Toluol getränkten Wattebausch. Bei Tieren entnimmt man das Blut auf die allgemein übliche Weise, z. B. bei Kaninchen aus der Ohrvene, nachdem man die Haare etwas abgerupft hat.

Der Einstich erfolgt beim Menschen in die gereinigte Hautstelle am besten mit einem spitzen, scharfen Messer oder dem Frankeschen Schnepper, den man so tief einstellt, daß er durch die Haut durchdringt. Den ersten entstehenden Tropfen wischt man scharf ab und nimmt die Blutentnahme nun so vor, daß man erst einen großen Tropfen sich ausbilden läßt und dann zur Aufsaugung das Blättchen an die Peripherie des Tropfens heranbringt. Man wiederholt dieses, nachdem sich ein weiterer Tropfen ausgebildet hat, sorgt aber dafür, daß man diesen mit einem noch nicht getränkten Teile des Löschpapiers aufnimmt. Nach Aufnahme von 3 bis 4 Tropfen ist im allgemeinen der untere Teil des Blättchens, bis ungefähr zum ausgestanzten Loch, mit Blut durchtränkt; es darf jedoch kein Blut auf der blutdurchsaugten Oberfläche stehen, da die Bildung dickerer Schichten die spätere Extraktion mit dem Lösungsmittel erschwert oder ganz

unmöglich macht. Während die Wägung der leeren Blättchen, die man zweckmäßig auf ein kleines Gestell aufreiht, das man sich durch Aufstecken von Stecknadeln mit etwas untergelegtem Kork in irgendein senkrecht stehendes Brett herstellt, längere Zeit vor der Abnahme, am besten gleich in einer größeren Serie erfolgen kann, muß die Wägung der mit Blut beschickten Blättchen sehr schnell vorgenommen werden, da sonst infolge Wasserverdunstung falsche Resultate gewonnen werden. Aus demselben Grunde ist es auch nötig, daß die Blutaufsaugung möglichst schnell geschieht. Sollten die Tropfen zu langsam heraustreten, so ist meist der Einstich nicht genügend tief; man macht in diesem Falle daneben einen zweiten, etwas tieferen Einstich. Läßt nach anfänglichem gutem Fließen der Blutaustritt nach, so handelt es sich um Gerinnung bzw. Verstopfung; man wird durch kurzes, wiederholtes scharfes Abwischen, wodurch außerdem eine Hyperämie erzeugt wird, in den meisten Fällen ein reichlicheres Fließen erzielen. Keinesfalls darf man die betreffende Stelle drücken oder quetschen, da sonst sich leicht Gewebssaft dem Blute beimischen kann. Bei diesen Mikromethoden müssen in jedem Falle mindestens zwei Parallelbestimmungen ausgeführt werden. Ferner ist, mindestens an jedem Tage einmal, eine Leerbestimmung unter Verwendung eines unbeschickten Blättchens erforderlich.

Man kann auch bei sonst ganz gleichem Verfahren die Abwägung des Blutes durch eine Messung ersetzen. Zu diesem Zweck sind genau kalibrierte, in cmm geteilte Pipetten notwendig, die 0,1 ccm fassen. Die Kalibrierung erfolgt am einfachsten durch Aufziehen von Quecksilber bis zur Marke und Abwiegen des aus der Pipette (nach Abwischen alles außen anhaftenden Quecksilbers) wieder herausgeblasenen Quecksilbers auf einer genauen analytischen Waage. Das Gewicht dieses Quecksilbers dividiert durch dessen spezifisches Gewicht (13,56) gibt den Inhalt der Pipette an. Man kann auch die Eichung in genügend genauer Weise so vornehmen, daß man, wie bei der üblichen Bangschen Bestimmung, ein Blättchen abwiegt, in die Pipette bis zur Marke Blut aufsaugt, dieses nach Abwischen

außen anhaftenden Blutes auf das Blättchen heraufbläst und das Blättchen schnell wieder wiegt. Das Gewicht gibt direkt den Inhalt in mg an. Man verfährt bei dieser Eichung genau so, wie unten für die Anstellung der Versuche beschrieben. Am besten ist es, wenn die Pipette genau 0,1 ccm oder 0,1 g Blut faßt und man sie vollständig mit Blut füllt, da dadurch die Rechnung erheblich vereinfacht wird. Wichtig ist es, daß man dieselben Pipetten für alle Versuche verwendet, da in diesem Falle auch bei kleinen Eichungsfehlern die Werte gut vergleichbar sind. Man muß wissen, ob man Volumteile oder Gewichtsteile abmißt. Im ersten Falle kann man für Blut das Gewicht sehr angenähert berechnen, wenn man das Volumen mit 1,05 multipliziert. Hat man anderseits den Wert eines Bestandteils für ein bestimmtes Volumen Blut berechnet, so erhält man den Wert, auf Gewicht berechnet, durch Division durch 1,05 bzw. Multiplikation mit 0,95.

Zur Blutentnahme verfährt man folgendermaßen. In die gereinigte Haut macht man in üblicher Weise einen Einstich mit dem Frankeschen Schnepper. Da die Abnahme mit der Pipette auf einmal erfolgen muß, dürfen die Blutstropfen nicht zu klein sein. Auch muß eine Gerinnung des Blutes verhindert werden, was man durch schnelles Arbeiten ohne Schwierigkeit erreicht. Ist eine genügend große Menge Blut ausgetreten, so führt man die Pipette in den Blutstropfen herein und saugt bis zur Marke Blut auf: entweder mit dem Mund oder mit einer kleinen Rekordspritze, deren Ansatz durch einen kurzen Schlauch mit dem oberen Ende der Pipette verbunden ist. Nach regelrechter Füllung bis zur Marke nimmt man die Pipette aus dem Blutstropfen heraus und wischt außen anhaftendes Blut sorgfältig weg. Man beschickt nun das Blättchen mit dem Blut, indem man dieses tropfenweise so aufsaugen läßt, daß es möglichst sich auf die Oberfläche des Blättchens verteilt. Die letzten Reste muß man — selbstverständlich Pipetten, die bis zum Ende geeicht sind, vorausgesetzt — durch Ausblasen herausbringen und zum Schluß das an der Spitze noch haftende Blut auf dem Blättchen abstreichen. Auf diese Weise gelingt es, das Blut quantitativ — mit Ausnahme eines

konstanten, an den Wandungen haftenden Restes auf das Blättchen zu überführen. Die weitere Verarbeitung geschieht wie bei den gewogenen Blättchen.

Vor jedem Versuch müssen die Pipetten rein und trocken sein: die Reinigung erfolgt zunächst mit kaltem Wasser, darauf mit Alkohol, endlich mit Äther: nachdem man diesen herausgeblasen hat, entfernt man die Reste durch kurzes Durchziehen durch eine Flamme.

Bestimmung der anorganischen Bestandteile.

Bestimmung des Wassergehaltes.

Die im allgemeinen sehr schwierige Bestimmung des Wassergehaltes wird durch Anwendung des Bangschen Prinzips der Aufsaugung des Blutes auf Löschpapierblättchen erheblich erleichtert. Die Wägung mit der Torsionswaage gibt jedoch höheren Ansprüchen nicht genügende Resultate: hiefür muß man die analytische Waage benutzen.

Ein passendes, mindestens doppelt so großes Blättchen, wie für die gewöhnlichen Bestimmungen nach Bang verwendet wird, wird in ein Wägegläschen gebracht, mit diesem, aber bei nicht aufgesetzten, sondern danebengelegten Deckel eine Stunde bei 100 Grad im Trockenschrank getrocknet, das Wägegläschen — Unterteil und Oberteil getrennt — in einen Exsikkator gebracht und nach vollständigem Erkalten geschlossen auf einer analytischen Waage gewogen. Man bereitet alles für die Blutentnahme vor, und wenn das Blut so reichlich austritt, daß die nötige Menge in kürzester Zeit aufgesaugt werden kann, bringt man das Blättchen aus dem kurz geöffneten Wägegläschen mit Hilfe einer Pinzette an die Bluttropfen heran, saugt auf, wie vorher beschrieben, überführt das vollgesaugte Blättchen schnell in das Wägegläschen und setzt den Deckel wieder auf. Bei der Blutentnahme ist besonders darauf zu achten, daß keine dicke Blutschicht entsteht, sondern daß das Blut in gleichmäßiger, möglichst dünner Schicht eingesaugt wird. Man wägt Wägegläschen mit Blättchen, notiert das Gewicht und bringt das Wägegläschen wieder in den Trockenschrank. Nach-

dem man den Deckel abgenommen hat, trocknet man zwei Stunden lang bei 100 Grad, überführt wieder in den Exsikkator und wägt wieder. Man bringt Wägegläschen mit Inhalt nochmals in den Trockenschrank herein, trocknet wie oben nochmals eine Stunde lang und führt wiederum nach Erkalten die Wägung aus. Stimmte dieses Gewicht mit dem nach einmaligem Trocknen erhaltenen überein, so ist die Trocknung beendet. Man kann in einfacher Weise nunmehr den Wassergehalt aus der Differenz der beiden Wägungen vor und nach dem Trocknen feststellen. Fand noch eine Gewichtsabnahme statt, so ist Trocknung und Wägung nochmals zu wiederholen, bis das Gewicht konstant geworden ist.

Beispiel: War das Gewicht des Wägegläschens mit leerem Blättchen (getrocknet) 12,435 g, nach Blutaufsaugung 12,865 g, so betrug die Menge des aufgenommenen Blutes 0,430 g. Das Gewicht des Gläschens mit Blättchen und getrocknetem Blut war 12,530 g, so daß die Menge des getrockneten Blutes 12,530—12,435 = 0,095 g war. In 0,430 g Blut sind also 0,095 g Trockensubstanz oder 22,1%. Der Wassergehalt ist dementsprechend 77,9%.

Bestimmung der Chloride.

a) Verfahren nach Bang.

Prinzip: Die Chloride werden durch Alkohol aus dem aufgesaugten Blute extrahiert; in der alkoholischen Lösung wird das Chlor mit Silbernitratlösung unter Verwendung von Kaliumchromat als Indikator bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. 92%iger Alkohol (genau!); 2. $^{1}/_{100}$ Normal-Silbernitratlösung; 3. 7%ige Lösung von Kaliumchromat.

Blutentnahme und Wägung der Blättchen erfolgt in der S. 62 ff. beschriebenen Weise.

Die Blättchen werden noch feucht in trockene Reagensgläser überführt und sofort mit 92%igem Alkohol übergossen, so daß dieser ungefähr ½ cm über dem obersten Rand der Blättchen steht. Man verschließt die Gläschen mit Stopfen und läßt mindestens 5 Stunden extrahieren — war das Blut schon ganz angetrocknet, was in der Regel bei längerem als 5minutigem Stehen nach der Ent-

nahme eintritt, so ist eine Extraktion von mindestens 24 Stunden erforderlich. Man gießt dann die Extraktionsflüssigkeit in ein kleines Wägegläschen oder Erlenmeyerkölbchen über, gibt zum Nachwaschen in das Reagensglas noch ca. 5—6 ccm Alkohol und vereinigt diesen nach 1stündigem Stehen mit der übrigen Lösung. Man gibt hiezu einen kleinen Tropfen des Indikators — größere Mengen Indikator sind zu vermeiden, da der Umschlag ungenauer wird — und titriert aus einer Mikrobürette mit der Silbernitratlösung unter ständigem Rühren mit einem dünnen Glasstäbchen, bis der Umschlag von gelb in hellbraun erfolgt. Zur besseren Erkennung des Umschlages stellt man das Gläschen auf eine weiße Platte. Wichtig ist gute Beleuchtung, am besten Tageslicht oder Gasglühlicht. Bei gelblichem Licht ist der Umschlagpunkt nicht zu erkennen.

Für die Ausführung dieser Bestimmung eignet sich sehr gut der Mikrotitrationsapparat (S. 7). Um die Erreichung des Endpunktes deutlicher zu machen, stellt man ein Kontrollgläschen mit der Endfarbe daneben.

Die Berechnung ist begründet auf der Tatsache, daß 1 ccm n/100-Silbernitratlösung 0,355 mg Chlor, bzw. 0,585 mg NaCl entspricht. Man braucht also nur die verbrauchten Kubikzentimeter der Silberlösung mit diesen Zahlen zu multiplizieren, um die Anzahl Milligramm Cl bzw. NaCl in der angewandten Blutmenge zu erhalten.

Die Angabe des vorhandenen Cl als NaCl ist nur konventionell: sie drückt nur aus, wieviel NaCl vorhanden wäre, wenn alles Cl an Na gebunden wäre, was aber bekanntlich in Wirklichkeit nicht der Fall ist.

Wurde die Volhardsche Titrationsmethode angewandt, so ist die Menge verbrauchten Silbernitrats aus der zunächst zugegebenen Menge abzüglich der verbrauchten Kubikzentimeter Rhodanlösung zu berechnen.

Beispiel: Gewicht des abgewogenen Blutes 110 mg. Zur Titration verbraucht 1,15 ccm Silbernitratlösung. Gehalt der Lösung an Cl $1,15 \cdot 0,355 = 0,408$ mg, in 100 mg 0,371 mg, in 100 g Blut 0,371 g Cl. Wird alles Chlor als NaCl berechnet, so ergibt sich der NaCl-Gehalt

in der angewandten Blutmenge zu 0,585 · 1,15 = 0,673 mg, der NaCl-Gehalt in 100 mg Blut zu 0,612 mg, der NaCl-Gehalt in 100 g Blut also zu 0,612 g bzw. zu 0,612%.

b) Bestimmung nach Veraschung[1]).

Prinzip: Nach Zusatz von Salpetersäure und Silbernitratlösung wird das Blut mit Hilfe von Permanganat verascht und in der erhaltenen Asche das überschüssige Silber durch Rhodanammonlösung zurücktitriert.

Erforderliche Reagentien: 1. $^1/_{100}$ n-Silbernitratlösung; 2. $^1/_{100}$ n-Rhodanammonlösung; 3. verdünnte Salpetersäure frei von salpetriger Säure, Cl-frei; 4. Kaliumpermanganatlösung, ungefähr $^1/_5$ normal; 5. Eisenoxydammoniakalaun, fein gepulvert; 6. reiner Traubenzucker, fein gepulvert (genau auf Cl-Freiheit zu prüfen).

Mit einer in Kubikmillimeter geteilten, 0,2 ccm fassenden Pipette nimmt man Blut aus der Fingerbeere, wischt das außen anhaftende Blut ab und bläst den Inhalt in ein kleines, ca. 30 ccm fassendes Kölbchen aus Jenaer Glas hinein. Wenn mehr Blut zur Verfügung steht, läßt man gerinnen und arbeitet mit Serum, das man ebenfalls mit der Pipette aufnimmt. Man wäscht die Pipette durch Aufsaugen wiederholt in doppelt destilliertem Cl-freiem Wasser aus, welches man in Menge von ca. 2 bis 3 ccm in einem Reagensglas bereit hat, und gibt dieses Wasser ebenfalls in das Kölbchen hinein. Man gibt dazu ca. 2 ccm verdünnte Salpetersäure, dann aus einer genauen Bürette oder Pipette 5 ccm Silbernitratlösung und 1—2 Tropfen Permanganatlösung (aus einer Tropfflasche). Man stellt das Kölbchen auf ein Asbestdrahtnetz, erhitzt mit kleiner Flamme zum Sieden und erhält dann 5 Minuten bei gelindem Sieden. Sobald infolge des Verbrauchs des Permanganats zur Oxydation die rote Farbe der Lösung verschwunden ist, wird tropfenweise von neuem Permanganat zugegeben und dies so oft wiederholt, bis die rote, bzw. rosa Farbe bestehenbleibt. Nach Ablauf von 5 Minuten wird die Flamme entfernt und der wenig abgekühlten Lösung zur Reduktion des überschüssigen Permanganats eine Messerspitze Traubenzucker zugefügt, wodurch die Lösung vollkommen entfärbt wird.

[1]) Ähnlich Rusznjak.

Weiteres Kochen ist unbedingt zu vermeiden. Nach dem Erkalten wird eine Messerspitze Eisenalaun zugegeben und, bis zum Erscheinen einer Rosafärbung, mit Rhodanammon titriert.

Zur Berechnung wird die zum Zurücktitrieren verbrauchte Menge Rhodanammonlösung von der zuerst zugefügten Silberlösung abgezogen und die Differenz mit 0,355 bzw. 0,585 multipliziert, je nachdem, ob man die in der angewandten Menge vorhandenen Milligramm Cl erhalten oder alles Cl als NaCl ausdrücken will.

Beispiel: Angewandte Blutmenge 0,2 ccm, zugegeben Silbernitratlösung 5 ccm, zum Zurücktitrieren 2,6 ccm, verbrauchtes Silbernitrat also 2,4 ccm. Gehalt an Chlor $0{,}355 \cdot 2{,}4 = 0{,}852$ mg Cl in 0,2 ccm bzw. 0,426 g in 100 ccm Blut. Gehalt an NaCl (wobei alle Chloride als NaCl angenommen werden) 0,585 multipliziert mit $2{,}4 = 1{,}404$ mg in 0,2 ccm bzw. 0,702 g in 100 ccm oder 0,702%.

Die Menge der Chloride im normalen Blut, als NaCl berechnet, beträgt ungefähr 650 mg%.

Bestimmung der Sulfate im Serum[1]).

Prinzip: Im enteiweißten Blutfiltrat wird die freie, bzw. nach Säurebehandlung die gesamte Schwefelsäure durch Benzidin gefällt und das verbrauchte Benzidin nach Oxydation mit H_2O_2 und Fe_2Cl_6 kolorimetrisch bestimmt.

Erforderlich: 1. Trichloressigsäure, 20%ige Lösung. Zur Reinigung wird das übliche Präparat unter vermindertem Druck destilliert, wobei zu 100 g der geschmolzenen Säure 5 ccm einer 0,5%igen Lösung der Benzidin-Base zugegeben wird. 2. Wasserstoffsuperoxydlösung: das übliche Produkt wird nach Bedarf 5mal mit Wasser verdünnt. 3. 0,5%ige Lösung von Fe_2Cl_6. 4. Reines Aceton. 5. 0,5%ige Lösung von Benzidinbase in Aceton (muß verworfen werden, wenn Lösung gelb geworden ist). 6. Testlösung. 2,0071 g Benzidinchlorid werden in 500 ccm n/5 HCl gelöst. 1 ccm dieser Lösung entspricht 1,5 mg SO_4. Von dieser Standardlösung werden mit n/5 HCl Verdünnungen auf das 10fache, 50- und 100fache hergestellt, entsprechend 0,15, 0,03 und 0,015 mg Sulfat.

---

[1]) Wakefield, Jl. of biol. chem. **81**, 713 (1929).

3 ccm Serum werden in ein kleines Zentrifugenglas pipettiert, dazu 3 ccm reines destilliertes Wasser, 3 ccm 20%ige Trichloressigsäure (1) und auf 15 ccm mit Wasser aufgefüllt. Nach guter Mischung und Zentrifugieren werden 5 ccm der klaren Lösung in ein anderes Zentrifugenglas mit feiner konischer Spitze, das schon 10 ccm der Benzidin-Basen-Lösung (5) enthält, pipettiert. Das bedeckte Reagenzglas bleibt mindestens 1/2 Stunde stehen und wird dann 30 Minuten lang in einer gut laufenden Zentrifuge mit einer Kappe zentrifugiert. Es wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen und das Röhrchen umgekehrt für einige Minuten auf trockenes Filtrierpapier gestellt und danach die Öffnung gut abgewischt. Es werden 15 ccm reines Aceton zugefügt, der Niederschlag mit einem feinen Glasstab zerteilt und gut gemischt, wieder eine Kappe aufgesetzt und wieder 15 Minuten in einer schnell laufenden Zentrifuge zentrifugiert. Hienach wird wieder Aceton abgegossen, das Röhrchen umgedreht und nach völligem Ablaufen der Flüssigkeit die inneren Wandungen mit Filtrierpapier getrocknet und ebenso die Öffnung des Gläschens. Es werden dann zur Lösung des Niederschlages 2 ccm n/5 HCl zugegeben und, wenn nötig, vorsichtig erwärmt. Zum abgekühlten Glas wird 6 ccm Wasser, 1 ccm verdünnte H_2O_2-Lösung (2) und 1 ccm Eisenchloridlösung (3) zugegeben, gemischt und 5 Minuten stehen gelassen. Die Färbung ist nach 5 Minuten vollständig entwickelt und bleibt 5 Minuten lang konstant, um dann schnell abzunehmen. Durch Zugabe von 0,5 ccm konzentrierter HCl zur Probe und zur Testlösung hält sich die Farbe länger. Wichtig ist in jedem Fall gleiche Acidität von Probe und Vergleichslösung.

Die Vergleichsproben müssen zu gleicher Zeit fertig werden wie die Versuchsprobe. Da die H_2SO_4 von 1 ccm Serum untersucht wird, muß auch 1 ccm Standard genommen werden, dem 1 ccm n/5 HCl, 6 ccm Wasser, 1 ccm verdünnter Peroxydlösung und 1 ccm der Eisenchloridlösung zugefügt wurden.

Die Berechnung ist die übliche: War die Standardlösung mit 0,15 mg im ccm angewendet worden und war bei Farbengleichheit im Kolorimeter die Schichthöhe der

Standardlösung 40, die der Versuchslösung 30, so berechnet sich die Menge des Sulfates zu $\frac{40}{30}$ mal $0{,}15 = 0{,}20$ mg im ccm, oder zu 0,20 mg%.

Zur Bestimmung der gesamten Schwefelsäure muß, wie auch beim Harn beschrieben wurde, die „Äther-Schwefelsäure" aufgespalten werden. Das geschieht durch Erhitzen von 5 ccm der bei der Entweißung mit Trichloressigsäure gewonnenen Flüssigkeit unter Zusatz von 2 Tropfen konzentrierter Salzsäure im Reagenzglas durch 15 Minuten langes Einstellen in kochendes Wasser. Es wird dann abgekühlt und im übrigen, wie angegeben, verfahren.

Normales menschliches Blutserum enthält 0,3—0,5 mg S als freie Schwefelsäure in 100 ccm, 1,0—1,5 mg% S als Gesamtschwefelsäure; im Vollblut ist die Menge der anorganischen Schwefelsäure ungefähr doppelt so hoch als im Serum, besonders hohe Werte sind bei Nephritis beobachtet worden.

Bestimmung der Phosphate.

a) Nephelometrische Methode.

Eine Mikrobestimmung der verschiedenen Fraktionen des Phosphors im Blutserum, und zwar einerseits des im wesentlichen anorganischen Phosphors und anderseits des Lipoidphosphors, dem kleine Mengen Protein- bzw. Nukleinphosphor beigemengt sind, läßt sich nach dem Prinzip von Greenwald durch Fällung des Blutes mit einer essigsäurehaltigen Pikrinsäurelösung bewirken, in welcher der erstere Teil löslich ist, während der Lipoid- bzw. Nukleinphosphor in den Niederschlag geht. Die beiden Fraktionen werden nach Trennung verascht und in den so erhaltenen klaren Lösungen mit Hilfe eines Molybdän-Strychnin-Reagens eine Trübung erzeugt, welche mit einer Trübung einer bekannten auf gleiche Weise behandelten Phosphatlösung im Nephelometer verglichen wird.

Erforderliche Reagentien: 1. In einer Lösung von 1 Teil konzentrierter Essigsäure (Eisessig) auf 99 Teile Wasser wird 1 Teil Pikrinsäure unter leichtem Erwärmen gelöst und die Lösung gut durchgemischt; 2. konzentrierte

Schwefelsäure; 3. rauchende Salpetersäure; 4. verdünnte Salpetersäure (1 Teil konzentrierte Salpetersäure spez. Gewicht 1,40 + 2 Teile Wasser); 5. Molybdänsäure-Strychnin-Reagens (Modifikation von Kleinmann): 30,4 g ammoniakfreie Molybdänsäure (MoO_3) (für Glühfäden, reinst, wasserfrei) und 9,6 g kristallwasserfreies Na_2CO_3 werden mit ungefähr 200 ccm Wasser so lange gekocht, bis sich die Molybdänsäure bis auf einige kleine Flocken (meistens Verunreinigungen) gelöst hat. Man filtriert, gibt der noch warmen Lösung 160 ccm konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19) zu und läßt erkalten. Anderseits wird eine Lösung von 1,6 g reinem Strychninbisulfat in ca. 100 ccm Wasser bei 90 Grad hergestellt und diese nach Erkalten zu der Molybdänsäurelösung gegeben. Man füllt die Mischung auf 1000 ccm auf und bewahrt in dunkler Flasche auf. 6. Phosphorsäure-Standardlösung: 302,9 mg $Na_2HPO_4 + 12\ H_2O$ werden in Wasser gelöst, die Lösung auf 1000 ccm aufgefüllt. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wird diese Stammlösung auf das 10fache verdünnt. Diese Lösung enthält in 5 ccm 0,03 mg P_2O_5. 7. Gummiarabicum-Lösung 10%. Herstellung: die kalt gesättigte Lösung von reinem Gummiarabicum (Vorschrift des Arzneibuches) wird mit 2 Teilen Wasser verdünnt. Die Lösung muß optisch leer sein, d. h. bei der gleichen Konzentration, die sie im Versuche hat (also 25 ccm Wasser + 2 ccm Lösung), keinen Tyndall-Effekt geben. Zweckmäßig wird die konzentrierte Lösung im Eisschrank aufbewahrt und Verdünnungen nur nach Bedarf (für ca. 1 Woche) hergestellt.

In prinzipieller Anlehnung an das Greenwaldsche Verfahren wird 1 ccm Serum, das durchaus hämoglobinfrei sein muß (es gibt sonst infolge des hohen Gehaltes der Blutkörperchen an Phosphatiden unkontrollierbare Verhältnisse), in einem Zentrifugenglas mit 8 ccm der Pikrinsäurelösung (1) versetzt und mit einem Glasstab gut durchgemischt. Man zentrifugiert in einer schnelllaufenden Zentrifuge scharf ab und gießt die überstehende Flüssigkeit, welche den anorganischen Phosphor enthält, in einen Mikrokjeldahlkolben vollständig ab. Man dampft bis zum Volumen von ungefähr 1 ccm ab, gibt nach Ab-

kühlen 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzu und erhitzt weiter, bis alle Pikrinsäure entfernt ist. Zum Schlusse fügt man einige Tropfen konzentrierte Salpetersäure hinzu und erhitzt nochmals. Die Pikrinsäure muß vollständig entfernt sein, auch die vielleicht an den Wandungen haftende, was durch kurzes Erhitzen des Kolbenhalses leicht erreicht wird. Nach Abkühlen fügt man ca. 10 ccm Wasser hinzu. Ist die Flüssigkeit nicht völlig farblos, so kann die vorhandene gelbliche Färbung entweder durch Stickoxyde bedingt sein oder eine nicht völlige Veraschung anzeigen. Durch Erwärmen muß in ersterem Falle die Färbung verschwinden und man kann die Lösung weiter verarbeiten. Im anderen Falle muß eingedampft und die Veraschung durch Zusatz neuer Salpetersäure zu Ende geführt werden. Nach Beendigung der Veraschung und Abkühlung überträgt man den Inhalt des Kölbchens unter wiederholtem Nachspülen mit destilliertem Wasser in ein Meßkölbchen von 50 ccm, gibt als Indikator 2 Tropfen p-Nitrophenol (s. S. 186) zu, neutralisiert mit ungefähr 10%iger Natronlauge[1]), bis ganz schwache Gelbfärbung entstanden ist, und füllt auf 50 ccm auf. Von dieser Mischung bringt man — je nach dem erwarteten P-Gehalt — 15 oder 25 ccm in ein Meßkölbchen von 50 ccm, gibt mit einer Pipette 5 ccm verdünnte Salpetersäure (4) hinzu und so viel Wasser, daß das Volumen ca. 40 ccm beträgt, und stellt zur Seite.

Zum Rückstand im Zentrifugenglas, der den Lipoid-Phosphor enthält, werden 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugegeben; nach einigem Stehen entsteht eine gleichförmige Mischung. Man gibt diese in einen Mikrokjeldahlkolben, spült mit möglichst wenig konzentrierter Salpetersäure nach und nimmt die Veraschung wie bei der anderen Probe vor. Diese erfolgt erheblich schwerer als die der Flüssigkeit. Man gibt in das Kölbchen von Zeit zu Zeit einige Tropfen konzentrierter Salpetersäure zu, gelegentlich auch einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, bis das Farbloswerden des Kolbeninhalts die völlige Veraschung des zunächst schwarz werdenden Gemisches

[1]) Natronlauge enthält bisweilen P: vorher prüfen!

anzeigt. Hienach läßt man erkalten und überführt die Flüssigkeit unter Beachtung der oben angegebenen Maßregeln in ein 50-ccm-Kölbchen, neutralisiert mit Natronlauge gegen Nitrophenol und verwendet 15—25 ccm der zur Marke aufgefüllten Lösung zur Analyse. Man gibt auch hier genau 5 ccm verdünnte Salpetersäure und Wasser bis zum Volumen von ungefähr 40 ccm hinzu und stellt ebenfalls beiseite. Die Vergleichslösung wird folgendermaßen hergestellt: Man bringt in ein 50-ccm-Kölbchen 5 ccm der Standardlösung mit einem Gehalt von 0,03 mg P_2O_5, fügt ebenfalls genau 5 ccm verdünnte Salpetersäure zu und verdünnt gleichfalls bis zu ungefähr 40 ccm. Man setzt nun zu jeden der 3 Meßkolben, deren Inhalt vorher gut durchzumischen ist, je 2 ccm des Molybdän-Strychnin-Reagens, das, wenn nicht ganz klar, vorher filtriert werden muß, füllt alle Kolben bis zur Marke auf und läßt 20 Minuten stehen. Hierauf wird zu jedem Kölbchen 2 ccm der Gummiarabicum-Lösung gefügt und gut durchmischt. Der Vergleich erfolgt im Nephelometer, bei dessen Benutzung auch ziemlich weit auseinanderliegende Differenzen (bis 1 : 4) richtig angegeben werden. Es schadet nichts, wenn die fertigen Proben bis zur Ablesung bis zu 2 Stunden stehenbleiben.

Beispiel: Es seien 1 ccm Serum in Arbeit genommen. Sowohl die säurelösliche Fraktion (also in der Hauptsache der anorganische Phosphor) wie die Fällung (Lipoidphosphor) seien nach Veraschung auf 50 ccm aufgefüllt und von diesen je 25 ccm zur nephelometrischen Bestimmung benutzt. Die Testlösung enthält in 50 ccm 0,03 mg. Würde im Nephelometer bei gleicher Schichtdicke der Testlösung und der Versuchslösung gleiche Helligkeit bestehen, so würden 25 ccm der Versuchslösung, die ja auf 50 ccm aufgefüllt waren, ebenfalls 0,03 mg P_2O_5 enthalten, 50 ccm dieser Lösung bzw. 1 ccm Serum, aus dem sie gewonnen ist, also 0,06 mg P_2O_5, d. h. 100 ccm Serum würden 6 mg P_2O_5 enthalten. Ist die Schichtdicke bei Gleichheit der Felder ungleich, so hat auch für die nephelometrische Ablesung das für die Kolorimetrie entwickelte Gesetz Geltung. Die Konzentration der Versuchslösung ist gleich der Konzentration der Vergleichslösung mul-

tipliziert mit dem Quotienten der Schichtdicke der Vergleichslösung durch die Schichtdicke der Versuchslösung oder $\frac{s_1}{s}$. Es sei für die anorganische Fraktion s_1 20 mm, s 30 mm; dann ergibt sich die Konzentration des anorganischen P_2O_5 in 100 ccm Serum zu $\frac{20}{30} \cdot 6$ mg P_2O_5 = 4 mg P_2O_5.

Sei anderseits für die Lipoidfraktion $s_1 = 40$, $s = 30$, so ergibt sich die Menge des Lipoid-P_2O_5 in 100 ccm Serum zu $\frac{40}{30} \cdot 6$ mg P_2O_5 = 8 mg P_2O_5.

Die Menge des P ergibt sich aus den erhaltenen Werten durch Multiplikation mit 0,437.

Normales Serum enthält ungefähr 4 mg% anorganischen, 2 mg% organischen P.

Wenn man, was nicht ganz der Fall ist, den organischen Phosphor nur als Lipoidphosphor betrachtet, kann man aus dem P-Gehalt durch Multiplikation mit 24,9 das Lecithin berechnen.

b) Kolorimetrische Bestimmung[1]).

Prinzip: Plasma bzw. Serum wird mit Trichloressigsäure enteiweißt. Das Filtrat dient ohne weitere Behandlung zur Bestimmung des anorganischen Phosphors, nach Veraschung zur Bestimmung des gesamten säurelöslichen Phosphors, also ausschließlich des Lipoidphosphors, jedoch einschließlich des sogenannten Rest-P (aus Zuckerphosphaten, vielleicht auch Nuklein-P).

Erforderliche Reagentien: 1. Trichloressigsäure 20%. 2. Molybdänsäurelösung. 3. Hydrochinonlösung. 4. Carbonatsulfitlösung. 5. Standardlösung mit 1 mg P in 1 ccm. Herstellung von 2 bis 5 s. S. 20. Zum Gebrauch wird die Standardlösung (5) auf das 200fache verdünnt, indem 5 ccm im Meßkolben auf 1000 aufgefüllt werden. Diese verdünnte Lösung enthält im ccm 0,005 mg P, in 5 ccm also 0,025 mg, in 10 ccm 0,05 mg P. Die Werte für P_2O_5 errechnen sich durch Multiplikation mit 2,29.

[1]) Nach Bell und Doisy

2,5 ccm Serum oder Plasma (zur Gewinnung des Plasmas verwendet man echtes Hirudin) werden in einem Meßkölbchen von 25 ccm mit ca. 15 ccm Wasser verdünnt, 2,5 ccm Trichloressigsäurelösung zugefügt, gut durchgeschüttelt und zur Marke aufgefüllt. Nach 10 Minuten wird durch ein (mit Säure gewaschenes) quantitatives Filter abfiltriert oder auch abzentrifugiert. Von der klaren Lösung werden je 10 ccm zur Bestimmung des anorganischen und des gesamten säurelöslichen Phosphors verwendet.

a) Anorganischer Phosphor. In einen 25-ccm-Meßkolben (oder graduiertes Röhrchen) werden 10 ccm des Filtrates und zu gleicher Zeit in einen anderen gleichen 5 ccm der verdünnten Vergleichslösung mit einem Gehalt von 0,025 mg P einpipettiert und dazu 4 ccm Wasser und 1,0 ccm der Trichloressigsäurelösung (1) gegeben. In beide Kölbchen wird nun je 1 ccm Molybdänsäurelösung und 2 ccm Hydrochinonlösung zugegeben und umgeschüttelt. Nach 5 Minuten langem Stehen wird je 5 ccm Carbonatsulfitlösung zugefügt und nach Mischen mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Nach 5—10 Minuten wird im Kolorimeter verglichen: die Menge des anorganischen P ergibt sich nach der bekannten Formel zu $0{,}025 \cdot \frac{s_1}{s}$ mg P, wobei s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung, s die der Versuchslösung bei Farbengleichheit im Kolorimeter bedeutet. Da nur $^2/_5$ der in Arbeit genommenen 2,5 ccm Serum (Plasma), also 1 ccm Serum (Plasma) zum Vergleich genommen wurden, ist die P-Menge in 100 ccm einfach durch Multiplikation mit 100 zu erhalten, so daß diese beträgt

$$0{,}025 \cdot \frac{s_1}{s} \cdot 100 \text{ mg in } 100 \text{ ccm.}$$

b) Gesamter säurelöslicher Phosphor. 10 ccm Trichloressigsäurefiltrat werden im kleinen Mikrokjeldahlkolben mit 6—8 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 (1,84) auf ca. 2 ccm eingeengt und unter Zusatz von 1 ccm konzentrierter Salpetersäure solange weiter erhitzt, bis die Lösung ganz klar und farblos geworden ist. Sobald weiße Dämpfe auftreten, unterbrechen, damit keine erheblichen

Mengen Schwefelsäure fortgehen! Die erkaltete Lösung wird in einen Meßkolben von 25 ccm mit ca. 8 ccm Wasser überspült, in ein zweites Kölbchen kommt 5 ccm der Vergleichslösung mit 0,025 mg P, ferner 5—6 Tropfen konzentrierte H_2SO_4. In beide Kölbchen werden nun nacheinander 1 ccm Molybdänsäurelösung und 2 ccm Hydrochinonlösung gegeben und gemischt. Nach 5 Minuten wird zu beiden Lösungen 10 ccm Carbonatsulfitlösung zugefügt, zur Marke aufgefüllt, gemischt und nach 5—10 Minuten die kolorimetrische Bestimmung angeschlossen.

Die Berechnung wird in gleicher Weise ausgeführt wie für den anorganischen Phosphor. Für die gleichen angewandten Mengen berechnet sich also der gesamte säurelösliche Phosphor in 100 ccm zu

$$2{,}5 \cdot \frac{s_1}{s} \text{ mg.}$$

Beispiel: Angewandt 2,5 ccm Serum, nach Enteiweißung auf 25 aufgefüllt. Zur Bestimmung des anorganischen P verwandt 10 ccm. War $s_1 = 30$, $s = 20$, so enthält das Serum $2{,}5 \cdot \frac{30}{20} = 3{,}75$ mg anorg. P in 100 ccm. War bei der Bestimmung des gesamten säurelöslichen P in ebenfalls 10 ccm Blutfiltrat $s_1 = 30$, $s = 15$, so betrug der Wert $2{,}5 \cdot \frac{30}{15} = 5$ mg in 100 ccm.

Die Phosphorwerte im Gesamtblut sind höher als im Serum oder Plasma: man wird daher geringere Mengen Blut in Arbeit nehmen (z. B. 1 ccm) bzw. statt 5 ccm Standardlösung mit 0,025 mg P 10 ccm mit 0,05 P wählen. Analysengang und Berechnung erfolgt im übrigen in der geschilderten Weise.

Die Bestimmung des anorganischen P muß sobald als möglich erfolgen, da sonst organischer Phosphor mitbestimmt wird.

Durch entsprechende Reduktion kann man die Methode auch in kleineren Mengen Serum oder Plasma (z. B. 1 ccm) ausführen, doch ist das Arbeiten mit der hier angegebenen Menge angenehmer und sicherer.

Bestimmung des Natriums[1]).

Prinzip: Natrium wird im Serum direkt als Pyroantimoniat gefällt: die abzentrifugierte Fällung wird mit Salzsäure gelöst und das Antimon durch Zusatz von Schwefelnatrium als Sulfid gefällt. Die erhaltene orangegelbe Farbe wird kolorimetrisch mit der einer gleichbehandelten Testlösung verglichen.

Gebrauchte Reagentien: 1. Pyroantimoniatreagens: 10 g gepulvertes Kaliumpyroantimoniat werden in 500 ccm kochendem Wasser (in einem Jenaer Kolben) aufgelöst, darauf unter fließendem Wasser schnell abgekühlt und 15 ccm 10%iger Kalilauge (natriumfrei) zugefügt. Die Lösung wird gut umgerührt und durch ein aschefreies Filter in eine mit Paraffin ausgegossene Flasche filtriert. Haltbarkeit bei Zimmertemperatur mindestens einen Monat; 2. Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,15 (3 Teile konz. HCl [1,19] gemischt mit einem Teil Wasser); 3. 10%ige Lösung von Natriumsulfid: bei Zimmertemperatur mindestens einen Monat haltbar; 4. Absoluter Alkohol; 5. 50 volumenprozentiger Alkohol aus gleichen Mengen von absolutem Alkohol und Wasser gemischt; 6. Gelatinelösung 5%ig; 7. Vergleichslösung (Natriumpyroantimoniatlösung): 1,108 g Natriumpyroantimoniat werden in 125 ccm Salzsäure 1,15 (2) aufgelöst und im Meßkolben mit destilliertem Wasser auf 1000 aufgefüllt. 1 ccm dieser Lösung entspricht 0,1 mg Natrium.

Zur Herstellung des Natrium-Pyroantimoniats werden zu 500 ccm Pyroantimoniatreagens (1) 50 ccm einer 2,5%igen Lösung von Natriumchlorid langsam zugefügt und zu der gut gemischten Lösung 110 ccm absoluter Alkohol unter fortwährendem Rühren zugegeben, wobei sich das Natriumpyroantimoniat ausscheidet. Man läßt 2 Stunden stehen und saugt dann durch einen mit einem feuchten Filter beschickten Büchnertrichter ab. Man wäscht mehrmals mit 300 ccm 50 volumenprozentigem Alkohol, bis das Waschwasser auf Zusatz von Salzsäure und Schwefelnatriumlösung keine Färbung mehr gibt. Der Niederschlag wird im Exsikkator getrocknet und aus dem so erhaltenen Präparat die Standardlösung hergestellt.

Man bringt 1 ccm Reagens (1) in ein konisches kleines Zentrifugenglas aus Jenaer oder Pyrex-Glas. Dazu gibt man 0,1 ccm Serum und darauf unter dauerndem Rühren

[1]) Joshimatsu, Tohoku Jl. of exp. med. 8, Nr. 4/5 (1927).

mit einem feinen Glasstab tropfenweise den 5. Teil, also 0,22 ccm absoluten Alkohol (4). Man läßt 15 Minuten stehen und zentrifugiert scharf den Niederschlag ab. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen, 2 ccm 50%iger Alkohol (5) zugegeben, wieder zentrifugiert und dieses dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugieren gießt man den Alkohol wieder ab und löst den Rückstand in 0,5 ccm Salzsäure (2). Man bringt dann den Inhalt unter Nachwaschen mit destilliertem Wasser in einen Meßkolben von 25 ccm. Anderseits bringt man in einen gleichen Kolben 3 ccm der Standardlösung (7) und gibt in beide Gefäße 10 ccm Wasser, 3 ccm der Gelatinelösung und 2,5 ccm Schwefelnatriumlösung (3). Es wird gut gemischt und mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt. Man vergleicht dann im Kolorimeter und berechnet die Natriummenge daraus, daß die Vergleichslösung 0,3 mg Natrium enthielt. Die Konzentration des Natriums im Serum wird also durch die Gleichung gegeben

$$c_1 = 0{,}3 \cdot \frac{s_1}{s} \text{ mg in } 0{,}1 \text{ ccm} \quad \text{bzw.} \quad c_1 = 0{,}3 \cdot \frac{s_1}{s} \text{ g}$$

in 100 ccm Serum bzw. %.

Beispiel: Angewandt 0,1 ccm Serum, die Schichtdicke der Vergleichslösung bei Farbengleichheit sei 20, die Schichtdicke der Versuchslösung 18, dann ergibt sich für die Konzentration des Natriums im Serum

$$0{,}3 \cdot \frac{20}{18} \text{ g in } 100 \text{ ccm} = 0{,}333\% \text{ Natrium.}$$

Der Bestimmung des Natriums im Vollblut muß eine Veraschung vorangehen, welche nach Yoshimatsu folgendermaßen vorgenommen wird. 0,1 ccm Blut werden in einem Platintiegel bei 110 Grad getrocknet. Dann wird dieser Tiegel in einen größeren Porzellantiegel oder Quarztiegel so hereingestellt, daß er in diesem auf einigen kleinen Porzellanscherben steht. Man erhitzt den äußeren Tiegel mit kleiner Flamme, bis keine Dämpfe mehr aufsteigen, bedeckt dann diesen großen Tiegel mit einem Deckel und erhitzt mit voller Flamme weiter, bis das Material in dem Platintiegel vollständig verascht ist. Das weitere Verfahren ist das gleiche wie eben beschrieben:

man löst die Asche in 0,5 ccm n/10 Salzsäure, alkalisiert mit wenigen Tropfen 1%iger Kalilauge und gibt diese Lösung in das bereits 1 ccm Reagens (1) enthaltende Zentrifugenglas. Man fügt dann wieder 1/5 des Gesamtvolumens, also in diesem Falle ca. 0,32 ccm absoluten Alkohol hinzu und verfährt sonst wie vorher beschrieben. Auch die Berechnung ist die gleiche.

Nach vorangegangener Veraschung gibt auch die S. 28 für Harn beschriebene Methode gute Resultate.

Bestimmung des Kaliums[1]).

Prinzip: Das Kalium wird direkt im Serum als Kobaltnitrit-Doppelverbindung gefällt und diese durch Kaliumpermanganat oxydiert.

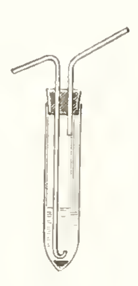
Erforderliche Reagentien: 1. Natrium-Kobaltnitritreagens. Es wird hergestellt Lösung A: 5 g Kobaltnitrat werden in 10 ccm Wasser gelöst und der Lösung 2,5 ccm Eisessig zugegeben. Lösung B: 24 g kaliumfreies Natriumnitrit werden in 36 ccm Wasser gelöst, was ungefähr 44 ccm Lösung ergibt. Zur Herstellung des fertigen Reagens werden zu der gesamten Lösung A 42 ccm der Lösung B zugefügt, wobei sich Stickoxyde entwickeln. Durch die Lösung wird so lange Luft durchgeblasen, bis keine Gase mehr entweichen. Das Reagens ist dann fertig und hält sich im Eisschrank mindestens einen Monat lang unverändert. Vor dem Gebrauch stets filtrieren. p_H des Reagenses 5,7. 2. 20 volumenprozentige Schwefelsäure (20 ccm konzentrierte Schwefelsäure + 80 ccm destilliertes Wasser). 3. $^1/_{100}$ n-Oxalsäurelösung hergestellt aus 10 ccm n/10 Oxalsäurelösung + 2 ccm n/10 H_2SO_4, mit Wasser auf 100 ccm zu verdünnen. 4. $^1/_{100}$ n-Kaliumpermanganatlösung.

Die Lösungen 3 und 4 müssen genau aufeinander eingestellt sein.

In ein Zentrifugenglas wird 1 ccm Serum, das möglichst schnell nach der Blutentnahme abzentrifugiert werden muß — es geht sonst K aus den Körperchen in das Serum über — einpipettiert und 2 ccm Kobaltreagens tropfen-

[1]) Nach Kramer und Tisdall.

weise unter leichtem Bewegen zugegeben. Nach $^3/_4$ Stunden werden ungefähr 2 ccm Wasser zugefügt und scharf abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, indem der kleine Apparat (Abb. 16) fest auf das Zentrifugenglas aufgesetzt wird und durch das Mundstück kräftig, aber vorsichtig Luft eingeblasen wird. Man kann auch einfach in ein Reagensglas abgießen: man kann so mit Sicherheit feststellen, ob nicht Niederschlag mitgegangen ist. Zum Rückstand werden ca. 3 ccm Wasser zugegeben, leicht gemischt, wieder zentrifugiert, das Wasser wieder abgeblasen und dieses Verfahren so oft (2—3mal) wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit ganz farblos ist. Nachdem nunmehr das Wasser in gleicher Weise entfernt worden ist, wird zum Rückstand ein Überschuß der Kaliumpermanganatlösung (ca. 5 ccm aus einer Mikrobürette genau gemessen) und 1 ccm Schwefelsäure zugefügt, mit einem dünnen Glasstäbchen aufgerührt und $1^1/_2$ Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, wobei die rote Farbe nicht völlig verschwinden darf. Ist dies dennoch der Fall, so muß etwas Permanganat nachgegeben und noch $^1/_2$ Minute erhitzt werden. Man nimmt aus dem Wasserbad heraus, gibt unter leichtem Umrühren aus einer anderen Mikrobürette Oxalsäurelösung dazu, bis die Flüssigkeit farblos wird. Aus der ersten Bürette gibt man dann so lange Permanganatlösung hinzu, bis gerade eine rötliche Färbung auftritt, die 1 Minute lang bestehen bleibt.


Abb. 16.

Berechnung: 1 ccm $^1/_{100}$ n-Kaliumpermanganat oxydiert so viel Kalium-Kobaltnitrit, wie 0,071 mg Kalium (dieser Wert ist empirisch festgestellt worden) entspricht. Durch Multiplikation der verbrauchten Kubikzentimeter Permanganat abzüglich der zugegebenen Oxalsäuremenge mit 7,1 erhält man die Milligramme Kalium in 100 ccm Serum.

Beispiel: Angewandt 1 ccm Serum, zugegeben 4 ccm $^1/_{100}$ n-Permanganatlösung, nach dem Kochen zur Entfärbung 2 ccm Oxalsäurelösung, 1,2 ccm Permanganat bis zur Rosafärbung. Zur Oxydation demnach erforderlich 4 ccm + 1,2 ccm — 2 ccm = 3,2 ccm. Durch Multi-

plikation mit 7,1 erhält man den Wert 22,72 mg K in 100 ccm Serum.

Der K-Gehalt des normalen Serums beträgt ungefähr 20 mg%.

Bestimmung des Calciums[1]).

Prinzip: Im hämolysierten Blut, im Plasma oder Serum wird mit Oxalat das Calcium ausgefällt und die aus dem Niederschlag freigemachte Oxalsäure mit Permanganat bestimmt.

Notwendige Reagentien: 1. 5%ige Ammoniumchloridlösung, 2. 3%ige Ammoniumoxalatlösung, 3. $^1/_{100}$ Normal-Kaliumpermanganatlösung, 4. n-Schwefelsäure.

a) Im Vollblut. Man bringt in ein 50 ccm-Meßkölbchen das mit ungefähr 20 ccm destilliertem Wasser beschickt und so gewogen war, 7—9 ccm Vollblut, wiegt wieder, mischt, gibt warmes destilliertes Wasser bis zur fast völligen Füllung zu, mischt gut durch und läßt zur vollständigen Hämolyse ungefähr $^1/_2$ Stunde lang stehen. Man füllt zur Marke auf, mischt wieder durch, bringt den Inhalt in ein oder zwei Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert nun scharf, so daß das Stroma sich vollständig am Boden absetzt und die Lösung ganz durchsichtig erscheint. Von dieser überstehenden Lösung wird ein aliquoter Teil (z. B. 15 ccm), der sehr vorsichtig zu entnehmen ist, damit keine Stromateilchen mitgenommen werden, in ein anderes Zentrifugenglas überführt, 1 ccm der Ammoniumchloridlösung (1) zugegeben, gut gemischt und dann sehr langsam unter dauerndem Mischen mit einem dünnen Glasstab 3 ccm der Oxalatlösung zugefügt. Mit anderen 15 ccm wird zweckmäßig eine zweite Bestimmung ausgeführt. Man läßt nun mindestens 16 Stunden stehen, damit das Calcium vollständig ausgefällt wird. Hienach zentrifugiert man scharf, gießt die überstehende Lösung ab, gibt unter leichtem Aufrühren des Niederschlages ungefähr 20 ccm kaltes destilliertes Wasser in das Röhrchen, zentrifugiert nochmals und wiederholt diese Prozedur, wenn der Niederschlag noch nicht rein weiß und die überstehende Flüssig-

[1]) Nach Clark.

keit noch gefärbt sein sollte. Das Ammonoxalat muß restlos entfernt sein. Um ganz sicher zu gehen, prüft man das Waschwasser daraufhin nach Zusatz von etwas Essigsäure mit Calciumchlorid, wobei sich kein Niederschlag bilden darf. Nach Abgießen des letzten Waschwassers gibt man zum Niederschlag 5 ccm n-Schwefelsäure (4), erwärmt das Röhrchen im Wasserbad auf 75—80 Grad und titriert bei dieser Temperatur unter dauerndem Rühren gegen einen weißen Untergrund mit n/100 Kaliumpermanganatlösung aus einer Mikrobürette, bis eine Rosafärbung die Beendigung der Reaktion anzeigt. Die beiden Analysen müssen auf 2 Teilstriche = $^2/_{100}$ ccm miteinander übereinstimmen.

b) Im Plasma. Das Blut wird mit Hirudin-Zusatz entnommen, zunächst die Blutkörperchen abzentrifugiert und das so erhaltene Plasma zur Analyse verwendet. Man nimmt 2—5 ccm Plasma in Arbeit, setzt die gleiche Menge Ammoniumchloridlösung wie für Blut und nach Mischen langsam 5—10 ccm einer 3%igen Ammonoxalatlösung zu. Im übrigen verfährt man wie beim Vollblut.

c) Im Serum. Dieses wird genau wie Plasma verarbeitet. Angewandte Menge meist 2 ccm. Die Bestimmung im Serum ist die meist angewandte.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß durch 1 ccm $^1/_{100}$ n-Permanganatlösung 1 ccm $^1/_{100}$ Normal-Oxalsäurelösung, entsprechend 0,6305 mg Oxalsäure $(COOH)_2 + 2\ H_2O$, oxydiert wird. Diese Menge entspricht anderseits 0,64 mg Calciumoxalat oder 0,2 mg Calcium. Es seien 9 g Vollblut in Arbeit genommen, auf 50 ccm aufgefüllt und 15 ccm davon weiter verarbeitet worden. Zur Titration der aus dem Calciumoxalat freigesetzten Oxalsäure seien im Mittel 1,6 ccm Permanganat verbraucht worden, dann wäre der Kalkgehalt der Probe $1,6 \cdot 0,2 = 0,32$ mg. Da nicht die ganze Blutmenge, sondern nur 15 ccm der auf 50 ccm verdünnten 9 g Blut zur weiteren Verarbeitung genommen worden waren, so muß diese Zahl, um den Kalkgehalt in 9 g Blut zu erhalten, noch mit $\frac{50}{15}$ multipliziert werden; wir bekommen also in 9 g einen

Kalkgehalt von $0{,}32 \cdot \frac{50}{15} = 1{,}067$ mg, also in 100 g Blut einen Kalkgehalt von 11,9 mg.

Unter Kalkgehalt wird stets die Menge an Ca, nicht an CaO verstanden.

Die Berechnung des Ca im Plasma und Serum erspart diese Umrechnung. Bei Anwendung von 2 ccm ergibt sich der Ca-Gehalt in mg in 100 ccm einfach aus den verbrauchten ccm n/100 Permanganat × 10.

Der Ca-Gehalt des normalen Blutes, auch des Serums, beträgt ungefähr 10—11 mg%.

Bestimmung des Calciums und Magnesiums.

Prinzip: Im vom Kalk befreiten Serum oder Plasma wird mit phosphorsaurem Ammonium phosphorsaure Ammoniak-Magnesia ausgefällt: Die Phosphorsäure der Verbindung wird kolorimetrisch bestimmt und daraus das Magnesium berechnet.

Gebrauchte Reagentien: 1. Molybdänsäurelösung (50 g Ammonmolybdat werden mit n-Schwefelsäure auf 1000 ccm gelöst). 2. Hydrochinonlösung: 20 g Hydrochinon werden auf 1000 ccm Wasser gelöst und 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt. 3. Carbonatsulfitlösung: 2 Volumina einer 20% Na_2CO_3 + aq.-Lösung und 1 Volumen einer 15% Na_2SO_3-Lösung werden gemischt. (Gut verschlossen aufbewahren. Hält sich höchstens 2 Wochen.) 4. Standardlösung: 5,605 g reines saures Kaliumphosphat (KH_2PO_4) [zu Enzymstudien nach Sörensen] wird auf 1 l gelöst. Die Lösung wird zum Gebrauch auf das 20fache verdünnt; 2 ccm dieser Lösung entsprechen 0,1 mg Mg. 5. Ammoniumoxalatlösung gesättigt. 6. Ammoniumphosphatlösung 2%ig. 7. Ammoniak 20%ig. 8. Ammoniaklösung 2%ig (10 ccm 20%iger Lösung mit Wasser ad 100). 9. n-Schwefelsäure. Ferner die zur Ca-Bestimmung nötige $^1/_{100}$ Normallösung (S. 82).

2 ccm Serum oder Plasma werden in einem Zentrifugenglas zur Entfernung des Calciums mit 3 ccm Wasser und 1 ccm Ammoniumoxalatlösung (5) versetzt und über Nacht stehengelassen. Nach dieser Zeit wird zentrifugiert

und von der klaren überstehenden Lösung 5 ccm in ein anderes größeres, konisches Zentrifugenglas überführt. Der Rückstand wird nach den S. 82 angegebenen Regeln zur Bestimmung des Ca verwendet.

Zur Flüssigkeit (5 ccm) werden 1 ccm Ammoniumphosphatlösung (6) und 2 ccm 20%iges Ammoniak (7) zugefügt, mit einem feinen Glasstab gemischt und das Zentrifugenglas mit Inhalt auf 5 Minuten in ein Wasserbad von 80 Grad eingestellt. Man nimmt heraus und läßt bis zum nächsten Tag leicht verschlossen stehen. Sodann wird scharf zentrifugiert, wobei sich der Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia am Boden des Zentrifugenglases absetzt. Es wird nunmehr die klare überstehende Flüssigkeit möglichst vollständig abgegossen, ungefähr die gleiche Menge 2%iger Ammoniaklösung (8) zugefügt und wieder zentrifugiert. Diese Behandlung wird noch zweimal wiederholt; nachdem die letzte Flüssigkeit abgegossen ist, wird ungefähr 0,5 ccm n-Schwefelsäure (9) zugegeben und auf diese Weise der Niederschlag gelöst. Durch leichtes Erwärmen wird dieser Prozeß, wenn er nicht ohnedies glatt vor sich gehen sollte, beschleunigt. Man spült nun mit 10 ccm destilliertem Wasser den Inhalt des Zentrifugenröhrchens quantitativ in ein Meßkölbchen von 25 ccm über. In ein zweites Meßkölbchen der gleichen Größe bringt man 2 ccm der auf das 20fache verdünnten Standardlösung (1) mit einem Gehalt von 0,1 mg Mg und gibt 8 ccm destilliertes Wasser dazu. Nach leichtem Mischen gibt man in jedes Kölbchen 1 ccm Molybdänsäurelösung (1), mischt kurz, fügt sodann je 2 ccm Hydrochinonlösung zu, mischt wieder und läßt 5 Minuten stehen. Danach werden in jedes Kölbchen 5 ccm der Carbonat-Sulfitlösung zugegeben und nach leichtem Umschwenken bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die erhaltenen durchmischten blauen Lösungen werden im Kolorimeter sofort verglichen.

Die Berechnung erfolgt auf Grund der Tatsache, daß in der Verbindung $MgNH_4PO_4$ mit dem Molekulargewicht 137,3 (phosphorsaure Ammoniakmagnesia, als welche das Magnesium ausgefällt worden ist) 31 Teile Phosphor 24,3 Teilen Magnesium entsprechen. Die Phos-

phatstandardlösung ist von dieser Überlegung ausgehend so hergestellt, daß 2 ccm der 20fachen Verdünnung (I) direkt 0,1 mg Mg entsprechen.

Beispiel: Der kolorimetrische Vergleich der aus dem Blut gewonnenen Lösung mit der Testlösung habe ergeben, daß Farbengleichheit bei einem Stand der Versuchslösung von 55 und der Testlösung von 30 war. Da die Vergleichslösung 0,1 mg entspricht, so ergibt sich nach der kolorimetrischen Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$ die Menge des in der Blutprobe enthaltenen Mg zu $0{,}1 \cdot \frac{30}{55} = 0{,}0545$ mg. Da 2 ccm Serum zunächst auf 6 ccm verdünnt, nach der Fällung des Calciums davon 5 ccm benutzt worden waren, ist der gefundene Mg-Gehalt in

$$2 \cdot \frac{5}{6} \text{ ccm Serum} = 1{,}67 \text{ ccm Serum}$$

enthalten. 100 ccm Serum enthalten also

$$\frac{0{,}0545 \cdot 100}{1{,}67} = 3{,}27 \text{ mg Mg.}$$

Die Menge des Magnesiums in normalem Blut beträgt ungefähr 2 mg %.

Bestimmung des Eisens.

Prinzip: Blut wird mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffsuperoxyd verascht, durch Zusatz von Rhodankali rotes Rhodaneisen gebildet, das kolorimetrisch mit einer Rhodaneisenlösung aus einer bekannten Menge Eisenchlorid verglichen wird.

Gebrauchte Reagentien: (Sämtliche Fe frei!) 1. Schwefelsäure konzentriert. 2. Wasserstoffsuperoxyd, 30%ige Lösung (Perhydrol). 3. Rhodankaliumlösung: 15 g Rhodankalium werden in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. 4. Eisenchlorid-Standardlösung, enthaltend 0,01 g Eisen im Kubikzentimeter (wird zweckmäßig fertig bezogen, kann auch durch Lösung von 2,90 g trocknem Eisenchlorid auf 100 ccm Wasser hergestellt werden. Die selbst hergestellte Lösung muß analytisch kontrolliert sein!).

Mit einer genauen Pipette von 0,1 ccm werden 0,1 ccm Blut entweder direkt aus der Fingerbeere oder von durch Hirudin oder durch 0,2% trockenes Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtem Blute entnommen. Die Pipette wird außen gut abgewischt, der Inhalt in einen Mikrokjeldahlkolben hereingeblasen. In einem Reagensglas, welches ungefähr 2 ccm destilliertes Wasser enthält, wird die Pipette wiederholt gut ausgespült und auch das Spülwasser in das Kölbchen gegeben. Es werden 25 Tropfen konzentrierte H_2SO_4 (ca. 0,8 ccm) zugefügt und das Kölbchen erst langsam, dann intensiver erhitzt, bis weiße Schwefelsäuredämpfe aufsteigen, und das Erhitzen dann noch 2 Minuten lang fortgeführt. Man läßt abkühlen, fügt ungefähr 0,5 ccm Wasserstoffsuperoxyd (2) dazu und erhitzt nochmals bis zur Bildung weißer Dämpfe und 2 Minuten länger[1]). Verändert sich die Färbung der Lösung nicht mehr — ein schwacher gelblicher Schein kann durch Eisengehalt bedingt sein —, so ist die Veraschung vollendet, sonst muß nochmals Perhydrol zugefügt und auf gleiche Weise die Veraschung fortgesetzt werden. Nachdem die Flüssigkeit ganz farblos geworden ist, läßt man abkühlen und überführt nach Verdünnen mit etwas Wasser die Lösung in ein Röhrchen mit Glasstopfen, welches je eine Marke bei 15 und 25 hat. Man spült mit Wasser aus dem Kjeldahlkolben nach, bis die Lösung bis zur Marke 15 geht, setzt den Glasstopfen auf und schüttelt um.

Anderseits wird die Vergleichslösung aus der Standardlösung folgendermaßen (frisch!) hergestellt. Zunächst werden 10 ccm der Lösung (1) auf das 50fache verdünnt, indem in einen Meßkolben von 500 ccm 10 ccm eingebracht und bis zur Marke aufgefüllt wird. Von dieser Lösung wird nochmals eine 10fache Verdünnung hergestellt, indem 10 ccm auf 100 ccm aufgefüllt werden. Von dieser Verdünnung, welche im Kubikzentimeter 0,02 mg Eisen enthält, werden 5 ccm enthaltend 0,10 mg Eisen in ein anderes gleiches Röhrchen eingefüllt, 20 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugefügt, ebenfalls mit Wasser

[1]) Es wird zweckmäßig ein kleiner Glastrichter auf das Kölbchen aufgesetzt, um Entweichen von H_2SO_4 zu vermeiden.

bis zu 15 ccm aufgefüllt und nach Aufsetzen des Glasstopfens gemischt. In beide Röhrchen kommen nun je 10 ccm Rhodankalilösung (3) (bis zur Marke 25): nach Aufsetzen des Stopfens wird gemischt und im Kolorimeter verglichen.

Beispiel: Es sei Farbengleichheit erzielt, wenn die aus der Standardlösung hergestellte Mischung die Schichtdicke 30, die aus dem Blut gewonnene Lösung die Schichtdicke 32 hat. Da die Testlösung 0,1 mg Fe enthält, so ergibt sich nach der wiederholt angegebenen Formel: $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$ die Konzentration des Eisens im Blut zu $0{,}1 \cdot \frac{30}{32}$ mg oder 0,0938 mg in 0,1 ccm. Dementsprechend enthalten 100 ccm Blut 0,0938 g oder 93,8 mg Fe.

Bestimmung der organischen Bestandteile.

Bestimmung des Reststickstoffes im Blut.

Unter der Bezeichnung: Reststickstoff werden die nichtkoagulierbaren stickstoffhaltigen Bestandteile des Blutes zusammengefaßt — Abbauprodukte des Eiweißes und der Purinkörper. Der Begriff ist nicht ganz feststehend, da je nach dem Enteiweißungsverfahren, durch welches die nichtkoagulierbaren Stoffe vor den koagulierenden getrennt werden, die Menge des „Reststickstoffs" etwas schwankt. Aus diesen Grunde ist bei fortlaufenden Bestimmungen stets dasselbe Enteiweißungsverfahren anzuwenden.

a) Halbmikrobestimmung im Serum nach Michaëlis.

Zur Enteiweißung erforderliche Reagentien: 1. kolloidales Eisenhydroxyd (möglichst chlorarm), 2. gesättigte $MgSO_4$-Lösung[1]). 2 ccm Serum werden mit einer Vollpipette in einen Meßkolben von 100 ccm überführt, ungefähr 50 ccm destilliertes Wasser langsam, um Schaumbildung zu vermeiden, zugefügt und 5 ccm kolloidales

[1]) $MgSO_4$ enthält häufig NH_3. Stets vor Gebrauch prüfen und reinste Präparate („mit Garantieschein") verwenden!

Eisenhydroxyd (Ferrum oxydatum dialysatum) zugegeben. Nach guter Mischung gibt man 2 ccm einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat zu, wodurch das gesamte Eiweiß mit dem adsorbierenden Eisenkolloid ausgefällt wird. Man verdünnt durch Auffüllen mit destilliertem Wasser bis zur Marke, mischt wiederum durch und läßt ungefähr 1/4 Stunde stehen, bis sich der Niederschlag etwas gesetzt hat. Darauf filtriert man durch einen trockenen Trichter mit Hilfe eines trockenen Filters in ein trockenes Gefäß und nimmt von dem Filtrat 50 ccm, entsprechend also 1 ccm des angewandten Serums, zur Bestimmung. War weniger Serum verfügbar, so kann man die Enteiweißung mit den halben Mengen vornehmen; in diesem Falle nimmt man aber eine größere Menge des Filtrates, 35 oder 40 ccm, die man leicht erhalten kann, zur Analyse. In einer kleinen Probe des Filtrates prüft man auf die Abwesenheit von Eiweiß, am besten durch Zufügen einiger Tropfen einer 10%igen Sulfosalicylsäurelösung; bei Gegenwart von Eiweiß sofort auftretende Trübung. Mit einer Pipette mißt man die zur Analyse verwandten 50 ccm in einen Mikrokjeldahlkolben, gibt 1 ccm bzw. 30 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure und 4 Tropfen 10%ige Kupfersulfatlösung dazu, dampft, nachdem man zum Vermeiden des Stoßens einige Glasperlen zugefügt hat, über kleiner Flamme das Wasser weg und verbrennt weiter, bis die zuerst schwarz, dann gelb gefärbte Lösung grünlich geworden ist. Man verfährt im übrigen genau wie bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffs im Harn (s. S. 41); auf die Prüfung der Reagentien wird besonders aufmerksam gemacht. Auch die Destillation erfolgt in der dort angegebenen Weise.

Berechnung: Wurden n/50 Normallösungen angewandt, so ergibt die Differenz zwischen vorgelegter Säure und verbrauchter Natronlauge, multipliziert mit 0,28, die Milligramme Reststickstoff in 1 ccm Blut.

Beispiel: 5 ccm n/50 H_2SO_4 vorgelegt, zum Zurücktitrieren (Indikator Methylrot) verbraucht 3,2 ccm n/50 NaOH. Differenz $1{,}8 \cdot 0{,}28 = 0{,}504$ mg Rest-N in 1 ccm, 50,4 mg in 100 Serum.

b) Halbmikrobestimmung nach Pincussen.

Zur Enteiweißung erforderlich: Trichloressigsäure 20%, Natrium-Wolframatlösung 10%. Zu 2 ccm Serum werden 16,4 ccm Wasser zugegeben, gemischt und 0,8 ccm 20%ige Trichloressigsäure zugefügt. Man mischt wieder und gibt nun 0,8 ccm 10% Wolframatlösung (s. o.) dazu. Es wird gut gemischt, abfiltriert und 10 ccm des eiweißfreien Filtrates, wie oben beschrieben, verascht. Weitere Behandlung wie bei A. Man erhält ebenfalls den Rest-N-Gehalt in 1 ccm Serum.

c) Halbmikrobestimmung nach Folin.

Zur Enteiweißung dient Wolframsäure, welche der Blutlösung zunächst als wolframsaures Natrium zugesetzt wird; durch Zusatz von Schwefelsäure wird die Wolframsäure in Freiheit gesetzt und die Koagulation bewirkt. Zur Enteiweißung nötige Reagentien: 1. 10%ige Lösung von Natriumwolframat, 2. 2/3 n-H_2SO_4 (hergestellt durch Mischen von 2 Vol. n-H_2SO_4 und 1 Vol. destilliertem Wasser).

Man kann mit Serum oder Vollblut arbeiten. Letzteres wird nach der S. 60 beschriebenen Methode durch Kaliumoxalat ungerinnbar gemacht. Man nimmt mit der Pipette 1 Vol. Blut oder Serum (je nach der zur Verfügung stehenden Menge 1, 2 oder mehr ccm) und überführt sie in eine mit einem Glasstopfen versehene Flasche, welche ungefähr die 20fache Menge dieses Volumens fassen kann. In ein Reagensglas bringt man destilliertes Wasser herein und pipettiert nun aus diesem durch die gleiche Pipette 7mal dasselbe Volumen, wodurch gleichzeitig die Pipette ausgewaschen wird. Man fügt zu der Lösung nunmehr 1 Vol. der Wolframatlösung und mischt die klare hämolytische Blutlösung bzw. Serummischung gut durch. Nun gibt man tropfenweise 1 Vol. der Schwefelsäure hinzu, wodurch infolge Freisetzung der Wolframsäure Koagulation entsteht. Nach Aufsetzen des Stopfens wird 6—8mal durch ruckweises Schütteln der Flasche gut durchgemischt. Man bereitet ein trockenes Faltenfilter vor, welches das ganze Volumen fassen kann, und filtriert durch dieses den ganzen Inhalt der Flasche in ein trockenes Gefäß, nachdem man

zuerst mit einigen Tropfen der Mischung das Filter etwas angefeuchtet hat. Von dem Filtrat werden zur Reststickstoffbestimmung 10 ccm verwendet, die also 1 ccm Blut entsprechen. Die Veraschung, Destillation und Titration erfolgt in der bei A angegebenen Weise. Die ebenfalls in gleicher Weise ausgeführte Berechnung ergibt die Menge Reststickstoff, der im Gesamtblut in der Regel etwas niedriger ausfällt als im Serum.

Die drei soeben beschriebenen Enteiweißungsmethoden sind auch für die Bestimmung anderer Blutbestandteile brauchbar. Vor allem die Folinsche Methode findet in diesem Sinne weitgehend Anwendung, besonders für die anderen von Folin ausgearbeiteten Blutbestimmungen, wie Harnstoff, Harnsäure, Blutzucker. Die Reststickstoffwerte, die nach den verschiedenen Verfahren erhalten werden, sind besonders infolge Adsorptionserscheinungen am niedrigsten bei der Methode von Michaëlis, am höchsten bei der Methode von Pincussen, doch sind die Unterschiede nicht sehr groß, im allgemeinen bis 10%. Es empfiehlt sich, Reststickstoffbestimmungen stets nach derselben Methode vorzunehmen, damit die genannten Differenzen nicht zu Trugschlüssen Anlaß geben.

Bestimmung des Gesamtstickstoffes.

Man verwendet bei den verhältnismäßig großen Mengen Gesamtstickstoff im Blut zweckmäßig eine kombinierte Methode. Man saugt in besonders dünne, stickstofffreie Löschpapierblättchen ungefähr 15—20 mg Blut auf, überführt das Blättchen nach dem Wägen sofort in einen Kjeldahlkolben und gibt 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 3 Tropfen Kupfersulfat und, zwecks schnellerer Veraschung, 2 ccm einer 2%igen Kaliumpermanganatlösung dazu. Man verascht wie gewöhnlich und destilliert nach einer der oben beschriebenen Methoden. Bei dem verhältnismäßig großen N-Gehalt des Gesamtblutes ist die S. 41 beschriebene Methode (Erhitzung und n/50 Lösungen) die einfachste und empfehlenswerteste. Die Berechnung erfolgt in üblicher Weise.

Bestimmung des Harnstoffes.

a) Halbmikromethode.

Prinzip: Das eiweißfreie Filtrat des Blutes wird mit Urease versetzt und das gebildete Ammoniak in gewöhnlicher Weise bestimmt.

Erforderlich: 1. Phosphatmischung. 13,6 g KH_2PO_4 und 83,5 g Na_2HPO_4 + 12 aq. in 500 ccm Wasser. 2. Ureaselösung.

In eine Flasche von 200 ccm Inhalt werden 3 g Permutit (Bezugsquelle: Permutitgesellschaft, Berlin) fein pulverisiert, eingefüllt und diese einmal mit ungefähr 100 ccm einer 2%igen Essigsäure gut durchgeschüttelt. Nach Absetzen des Permutits wird die Essigsäure abgegossen und in gleicher Weise das Pulver zweimal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Nach Abgießen des letzten Spülwassers gibt man in die Flasche 5 g feingepulvertes Sojabohnenmehl oder Jackbeanmehl (Mehl der Bohnenart Canivalia ensiformis) und 100 ccm 30%igen Alkohol (hergestellt aus 35 ccm 95%igem Alkohol und 65 ccm Wasser). Man schüttelt 1/4 Stunde gut durch, läßt absetzen und filtriert. Die Lösung hält sich bei Zimmertemperatur ungefähr 1 Woche wirksam, im Eisschrank 3—5 Wochen.

Vollblut oder Serum wird in der (S. 90) angegebenen Weise mit Wolframsäure enteiweißt. Zur Harnstoffbestimmung dient ein aliquoter Teil, in der Regel 10 ccm, entsprechend 1 ccm Blut, der in das Reagensglas A der Apparatur S. 34 eingefüllt wird. Zur Überführung des Harnstoffs in Ammoniak wird eine Messerspitze Urease oder 2 ccm Ureaselösung zugefügt.

Außerdem gibt man in das Reagensglas 3 ccm Phosphatmischung (1) und stellt das Reagensglas während 15 Minuten in ein Wasserbad von 45 bis 50 Grad ein. Man destilliert das gebildete Ammoniak in dem S. 34 beschriebenen Apparat über unter Vorlage von 5 ccm n/50 H_2SO_4. Die Temperatur kann hiebei auf 65—70 Grad gesteigert werden. Zur Verhinderung des Schäumens wurden in das Destillationsgefäß 2 ccm Paraffinum liquidum und 6 Tropfen Oktylalkohol gegeben. Tritt während der Destillation erneut Schäumen auf, so fügt man durch den Trichter einige Tropfen Oktylalkohol erneut zu. Titration mit n/50 NaOH in S. 36 beschriebener Weise mit Methylrot als Indikator. Durch Multiplikation der Differenz zwischen vorgelegter und zurücktitrierter Säure mit 0,28 erhält

man die Milligramm Harnstoff-N in der angewandten Blutmenge in Milligramm, durch Multiplikation dieser Zahl mit 2,143 die Menge Harnstoff. Multiplikation der Differenz mit 0,60 ergibt sinngemäß sofort die Harnstoffmenge in Milligramm.

b) Xanthydrolmethode.

Prinzip: Im mit Trichloressigsäure enteiweißten Blutfiltrat wird Dixanthylharnstoff gefällt. Der N-Gehalt wird nach Veraschung bestimmt.

Nötige Reagentien: 1. Trichloressigsäurelösung 20%. 2. Eisessig. C. Xanthydrollösung 10% in Methylalkohol. 4. Methylalkohol, ferner die für die N-Bestimmung nach Kjeldahl nötigen Reagentien.

2 ccm Serum werden nach Zusatz von 6 ccm Wasser mit 2 ccm Trichloressigsäurelösung enteiweißt und vom Niederschlag abfiltriert bzw. abzentrifugiert. 5 ccm Blutfiltrat werden in einem kleinen Jenaer Zentrifugenglas mit 5 ccm Eisessig und in gleicher Weise wie beim Harn (S. 40) beschrieben, mit 3mal 0,25 ccm Xanthydrollösung versetzt. Nach dem letzten Zusetzen wird 1 Stunde stehengelassen, abzentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen, der Rückstand nach Aufwirbeln mit Methylalkohol gewaschen und nach Zentrifugieren die klare Flüssigkeit wieder entfernt. Der Rückstand wird auf einem Sandbad oder dgl. getrocknet, darauf ca. 6 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure, 2 Tropfen Kupfersulfatlösung und etwas Perhydrol zugefügt. Nach den S. 40 angegebenen Regeln wird unter wiederholter Zugabe von Perhydrol verascht und die Destillation und Titration in der S. 41 angegebenen Weise vorgenommen.

Berechnung: Die Menge der vorgelegten n/50 Schwefelsäure weniger die zum Zurücktitrieren verbrauchte Natronlauge multipliziert mit 28 gibt die mg Harnstoff-N in 100 ccm Blut. Durch Multiplikation der Differenz mit 60 erhält man direkt die mg Harnstoff in 100 ccm Blut.

Bestimmung der Aminosäuren[1]).

Prinzip: Das gleiche wie bei der Bestimmung im Harn, S. 46, beschrieben.

---

[1]) Nach Folin.

Gebrauchte Reagentien: 1. Natriumcarbonatlösung: 50 ccm einer fast gesättigten Lösung von Natriumcarbonat werden auf 500 ccm verdünnt. Die Lösung muß jetzt so eingestellt werden, daß 8,5 ccm (Methylrot als Indikator) 20 ccm n/10 HCl entsprechen. Zu diesem Zweck werden 20 ccm n/10 HCl in einen Kolben pipettiert, einige Tropfen Methylrot zugegeben und von der verdünnten Natriumcarbonatlösung so lange zugegeben, bis die rote Färbung gerade in gelb umschlägt. Je nach der verbrauchten Menge ist die Lösung zu verdünnen. Wurden z. B. nur 7,5 ccm Natriumcarbonatlösung verbraucht, so ist die Verdünnung so vorzunehmen, daß 7,5 ccm mit destilliertem Wasser auf 8,5 ccm zu verdünnen sind. Will man z. B. 500 ccm der richtig verdünnten Lösung herstellen, so geschieht das nach der Formel $7,5 : 8,5 = x : 500$, woraus sich berechnet $x = \frac{500 \cdot 7,5}{8,5}$ oder 441. Es müssen also 441 ccm der zunächst hergestellten verdünnten Natriumcarbonatlösung auf 500 im Meßkolben aufgefüllt werden. 2. Essigsäureacetatlösung: 100 ccm 50%ige Essigsäure werden mit der gleichen Menge einer 5%igen Lösung von Natriumacetat vermischt. 3. Thiosulfatlösung 1%ig in Wasser. 4. Glykokoll-Vergleichslösung: 70 ccm der S. 46 beschriebenen Vergleichslösung für Harn werden mit n/10 Salzsäure auf 100 aufgefüllt (die Lösung muß spätestens jeden Monat neu hergestellt werden). 5. Reagenslösung: frisch bereitete Lösung von 0,1 g naphthochinonsulfosaurem Natrium (s. S. 46) in 20 ccm Wasser. 6. 7. die S. 90 zur Enteiweißung angegebenen Reagentien: wolframsaures Natrium 10%ig und 2/3 n-Schwefelsäure.

Von der nach S. 90 nach Folin enteiweißten Blutlösung (wenn keine andere Bestimmung ausgeführt wird, genügt es, 2 ccm Blut bzw. Serum zu enteiweißen) werden 10 ccm in ein großes Jenaer Reagensglas einpipettiert, das eine Marke bei 25 trägt. In ein zweites gleiches Glas wird 1 ccm der Vergleichslösung (4) einpipettiert und 8 ccm destilliertes Wasser zugefügt. In beide Gläser kommt nun 1 Tropfen einer 0,25%igen Phenolphthaleinlösung, in das Röhrchen mit der Vergleichslösung sodann 1 ccm

Natriumcarbonatlösung (1), wodurch der Inhalt des Glases sich rötlich färbt. Man gibt nun in das Röhrchen mit der Versuchslösung tropfenweise Natriumcarbonatlösung zu, bis die Färbung der der Kontrollösung entspricht, wozu im allgemeinen ungefähr 25 Tropfen, gelegentlich etwas mehr oder weniger, gebraucht werden. Nun wird in jedes Glas 2 ccm der Reagenslösung (5) zugefügt, leicht gemischt und die Proben mindestens 16 Stunden an einem dunklen Ort stehengelassen. Am nächsten Tag wird in jedes Röhrchen zunächst 2 ccm Essigsäureacetatgemisch (2) unter leichtem Mischen zugefügt und dann ebenfalls in jedes Röhrchen je 2 ccm der Thiosulfatlösung (3) zugegeben. Es wird bis zur Marke 25 mit destilliertem Wasser ergänzt, gut vermischt und sofort im Kolorimeter verglichen.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß die Kontrolle 0,07 mg N als Amino-N enthält. Die in der angewandten Menge Blutfiltrat (10 ccm entsprechen 1 ccm Blut) enthaltene Amino-N-Menge berechnet sich nach der kolorimetrischen Formel, also zu $c = 0{,}07 \cdot \frac{s_1}{s}$ mg, wobei s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung, s die Schichtdicke der Versuchslösung bei Farbengleichheit bedeutet.

Beispiel: Bei Farbengleichheit sei die Schichtdicke der Vergleichslösung 25, die der Versuchslösung 20. Der Gehalt an Amino-N in der angewandten Blutmenge (1 ccm) ist $0{,}07 \cdot \frac{25}{20}$ mg = 0,0875 mg, 100 ccm enthalten also 8,75 mg Amino-Stickstoff.

Der Amino-Stickstoff beträgt in normalem Blut 6–8 mg%.

Bestimmung von Ammoniak[1]).

Das Prinzip ist dasselbe wie für Harn beschrieben. Das Ammoniak wird durch Zusatz von Alkali aus dem Blut in einem geschlossenen System freigemacht und in einem Röhrchen, das mit verdünnter Salzsäure beschickt ist, aufgefangen. Die Menge des Ammoniaks wird nach Versetzen mit Neßlers Reagenz durch Vergleich mit Lösungen

[1]) Nach Nash und Benedict. Jl. of. biol. chem. (1921).

bekannten Gehaltes, die in gleicher Weise behandelt wurden, ermittelt.

Erforderlich: (Alle Reagentien müssen peinlich frei von NH_3 sein, wie auch der Arbeitsraum keine NH_3-Dämpfe enthalten darf.) 1. Kaliumoxalat, ammoniakfrei, wenn nicht rein erhältlich, durch wiederholtes Umkristallisieren mit NH_3-freiem Wasser (dieses ist zu gewinnen durch Destillieren sehr verdünnter H_2SO_4) zu erhalten. 2. n/10 HCl. 3 Tropfen in 5 ccm NH_3-freiem Wasser dürfen mit Neßlers Reagenz keine Färbung geben. 3. Carbonat-Oxalat-Lösung. 8 g K_2CO_3 und 12 g Kaliumoxalat (+ aqu.) werden in ca. 50 ccm NH_3-freiem Wasser gelöst, auf die Hälfte eingedampft, mit NH_3-freiem Wasser verdünnt, wieder auf kleines Volumen eingeengt, schließlich mit NH_3-freiem Wasser auf 80 ccm aufgefüllt. 4. Neßlers Reagenz (Vorschrift von Bock-Benedict). In einen Liter-Kolben werden 100 g Hg J_2 und 70 g KJ eingebracht und 400 ccm Wasser zugegeben und bis zur Lösung geschüttelt. Anderseits werden 100 g NaOH in 500 ccm Wasser gelöst und die abgekühlte Lösung unter dauerndem Schütteln in den 1000 ccm Kolben zugegeben und nach Mischen die Lösung auf 1000 verdünnt. Sollte die Lösung nicht ganz klar sein, absetzen lassen und nach vollständiger Klärung abdekantieren. 5. Capryl-Alkohol. 6. Standardlösung. 1,717 g Ammoniumsulfat werden auf 1 l verdünnt. 1 ccm dieser Lösung enthält 1 mg NH_3-N. Zur Herstellung der erforderlichen Teste werden 2 ccm Lösung im Meßkolben auf 500 ccm verdünnt. Diese Lösung enthält dann 0,4 mg% NH_3-N.

Die Destillation erfolgt unter Luftdurchleitung, wie bei Harn beschrieben, doch sind bei den sehr geringen Mengen von NH_3 im Blut besondere Vorsichtsmaßregeln erforderlich. Die Röhren sind sehr hoch, um ein Überspritzen hintanzuhalten; es werden als Verschluß Glasstopfen verwendet, in welche die Röhren zur Durchleitung der Luft eingeschmolzen sind und nur die Verbindung zwischen dem Aufnahmerohr für das Blut und dem Auffangerohr für das Ammoniak erfolgt, möglichst Glas an Glas, durch einen Gummischlauch. Wie aus der Figur ersichtlich, sind an den Einführungsröhren Glasplatten angeschmolzen,

um gebildeten Schaum zu zerteilen. Zur sicheren Entfernung des NH_3 der Luft werden vor das System, d. h. also vor die das Blut enthaltenden Flasche, 2—3 Waschflaschen mit verdünnter H_2SO_4 und zunächst der das Blut enthaltenden Flasche noch eine weitere Waschflasche mit 1%iger HCl geschaltet. Die Durchsaugung der Luft erfolgt in üblicher Weise durch eine Wasserstrahlpumpe, deren Schlauch an dem kurzen Schenkel der Auffangeflasche aufgesetzt wird.

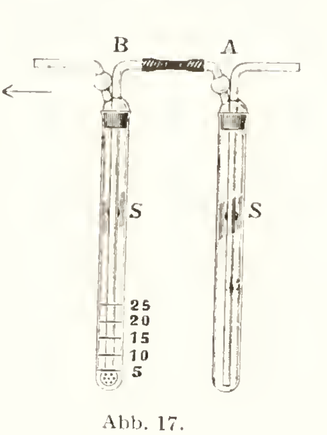


Abb. 17.

Die Auffangeflasche B wird mit 5 ccm NH_3-freiem Wasser und 2—3 Tropfen n/10 HCl beschickt, in die erste Flasche A kommen 5 ccm gut gemischtes Oxalat-Blut, dazu 1 ccm der Carbonat-Oxalat-Lösung (3) und 1 Tropfen (nicht mehr) Capryl-Alkohol. Der Apparat wird schnell zusammengesetzt — es war vorher festgestellt, daß die Glasstopfen gut schließen — und während 15 Minuten ein mäßiger Luftstrom durch das System gesaugt.

Inzwischen wurden in eine Reihe von Reagenzgläsern mit genau demselben Durchmesser wie das Auffangegefäß Verdünnungen der verdünnten Standardlösung (mit 0,4 mg % NH_3) hergestellt. Für die meisten Zwecke werden folgende Mischungen zweckmäßig sein:

Nr.	ccm verdünnte Standardlösung	ccm Wasser	mg % NH_3-N
1	5,0	0,0	0,40
2	4,0	1,0	0,32
3	3,0	2,0	0,24
4	2,5	2,5	0,20
5	2,0	3,0	0,16
6	1,5	3,5	0,12
7	1,0	4,0	0,08
8	0,5	4,5	0,04

Nach Beendigung der Destillation wird sowohl zu dem Inhalt des abgenommenen Auffangegefäßes wie auch zu jedem der Vergleichsproben 2 Tropfen des unverdünnten

Neßlerschen Reagenz (4) zugegeben und aus dem Vergleich die Menge des NH_3-N im Blute ermittelt.

Der Mittelwert des NH_3-N im normalen Blute beträgt nach Nash und Benedict um 0,2 mg %.

Für besondere Zwecke kann man die Reihe der Vergleichsproben natürlich enger machen, bzw. nach der einen oder anderen Seite ausdehnen.

An Stelle des Nesslerschen Reagens benutzen D. D. van Slyke und Hiller (Jl. of biol. chem. Bd. 102, S. 500) ein Natrium-Phenolat-Reagens folgender Zusammensetzung. 25 g Phenol werden in wenig Wasser gelöst, 50 ccm 40%ige Natriumhydroxyd-Lösung zugegeben und auf 100 ccm verdünnt. Zur Erzeugung der Färbung wird Chlorwasser verwendet, das folgendermaßen hergestellt wird. 50 g Calciumhypochlorit (mit 56% freiem Chlor) wird in ungefähr 500 ccm heißem Wasser gelöst. Diese Lösung wird mit einer Lösung von 50 g K_2CO_3 (wasserfrei) in 200 ccm kaltem Wasser gemischt und auf 1000 ccm aufgefüllt. Es ist zu prüfen, ob auf Zusatz von mehr K_2CO_3-Lösung die klare Lösung sich trübt; in diesem Falle ist Carbonat-Lösung zuzugeben, bis alles Calcium ausgefällt ist. Die klare Lösung wird in kleine Flaschen abgefüllt, die im Eisschrank aufbewahrt werden. Von Zeit zu Zeit muß in der in Gebrauch befindlichen Flasche der Gehalt an aktivem Chlor bestimmt werden. Hiezu werden zu 5 ccm Chlorlösung 25 ccm Wasser und 0,25 g KJ sowie 2 ccm Eisessig gegeben und mit n/10 Thiosulfat titriert. Die Lösung soll 1 g Chlor in 100 ccm enthalten.

Nach beendeter Luftdurchsaugung, die wie oben beschrieben durchgeführt wird, wird in das Auffanggefäß ebenso wie in die Gläser mit den Vergleichslösungen je 1 ccm der Phenolatlösung und 0,5 ccm Chlorlösung gegeben, gemischt und die Gläser 3 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt; nach Abkühlen unter fließendem Wasser werden die Färbungen entweder wie bei der Nash-Methode angegeben direkt oder im Kolorimeter verglichen.

Bestimmung der Fraktionen des Bluteiweißes.

Prinzip: Es wird bestimmt 1. das gesamte Eiweiß im Plasma oder Serum, 2. der Gesamtstickstoff aus

Fibrinogen (nur im Plasma) als Differenz zwischen dem Gesamt-N und dem N nach Fibrinogenausfällung, 3. Albumin-N im Filtrat der Globulinfällung, 4. Globulin-N nach Abzug des Albumin-N vom Gesamt-N im Serum; als Differenz zwischen Gesamt-N und Albumin-N + Fibrinogen-N im Plasma.

Erforderlich: 1. NaCl-Lösung 0,9%, 2. $CaCl_2$-Lösung 2,5%, 3. Na_2SO_4-Lösung (wasserfreies Sulfat), 22,2%ig. Ferner die zur Mikrokjeldahl-Bestimmung nötigen Reagentien (s. p. 42).

Der Gesamt-Protein-N wird in der S. 91 geschilderten Weise bestimmt.

Zur Bestimmung des Fibrinogens wird 1 ccm Plasma in einen 50-ccm-Meßzylinder mit Glasstopfen einpipettiert, 48 ccm NaCl-Lösung (1), 1 ccm $CaCl_2$-Lösung (2) zugefügt, gut gemischt und mindestens 20 Minuten stehen gelassen. Durch kreisförmige Bewegung des Zylinders bringt man das Gerinsel an die Wandungen oder man wickelt durch Rühren mit einem Glasstab das Fibringerinnsel an diesem auf, so daß eine klare Lösung entsteht. Von dieser werden 10 ccm, entsprechend 0,2 ccm Plasma, zur N-Bestimmung verwandt, die nach dem S. 42 angegebenen Verfahren erfolgt.

Zur Bestimmung des Albumins gibt man in einem 50-ccm-Meßzylinder mit Glasstopfen zu 1 ccm Plasma oder Serum genau 29 ccm der Natriumsulfatlösung (3), nachdem man sie zuvor auf 37 Grad erwärmt hat. Man stellt den Zylinder geschlossen 3 Stunden in einen Brutschrank oder in ein Wasserbad von 37 Grad und filtriert dann durch ein dichtes, trockenes Filter in ein trockenes Reagensglas, wobei der Trichter während des Filtrierens mit einem Uhrglas zu bedecken ist. Wird das Filtrat nicht klar, so muß man auf das Filter zurückgießen, um eine ganz klare Lösung zu bekommen. Vom Filtrat werden 9 ccm, entsprechend 0,3 ccm Serum oder Plasma, zur Analyse genommen.

Schließlich wird nach einer der S. 88 angegebenen Methoden eine Bestimmung des Rest-N ausgeführt.

Im übrigen können bei von der Norm abweichendem Werten der einzelnen Fraktionen größere oder geringere Mengen als hier angegeben zur N-Bestimmung genommen werden.

Berechnung. Die Berechnung der N-Werte erfolgt wie a. a. O. angegeben. Aus den N-Werten wird der Wert der verschiedenen Eiweißfraktionen durch Multiplikation mit 6,25 berechnet.

Beispiel für Plasma. Der gefundene Wert des Gesamt-N betrug 1250 mg%, von dem der Rest-N-Wert von 80 mg% abzuziehen ist. Es beträgt also der gesamte Eiweiß-N 1170 mg%, das Gesamteiweiß also 7,31%. Das Fibrinogenfiltrat habe 1095 mg% N enthalten, abzüglich also vom gefundenen Gesamt-N mit Ausschluß des Rest-N habe der Fibrinogen-N 1170 — 1095 = 75 mg% betragen, also auf Eiweiß umgerechnet, 0,47% Fibrinogen. Die Albuminfraktion nach Ausfällung des Globulins enthielt 970 mg%, nach Abzug der 80 mg% Rest-N also 890 mg%, entsprechend 5,56% Albumin. Das Globulin endlich berechnet sich aus dem gefundenen Gesamt-N abzüglich der Summe Fibrinogen + Albumin, in unserem Falle also zu 7,31— (5,56 + 0,47), also zu 1,28%.

Die Berechnung im Serum vereinfacht sich entsprechend, weil dieses Fibrinogen nicht enthält. Es ist also das Globulin gleich der Differenz zwischen Gesamt-Eiweiß und Albumin.

Bestimmung des Zuckers.

a) Methode nach Ivar Bang.

Prinzip: Durch den Blutzucker (oder richtiger die reduzierenden Substanzen des Blutes) wird Kupfersulfatlösung reduziert: das gebildete Kupferoxydul wirkt auf Jodsäure und reduziert diese, indem sich wiederum Kupferoxydstufe bildet. Die Menge des reduzierten Jodates wird titrimetrisch mit Thiosulfat ermittelt.

Erforderliche Reagentien: 1. Salzlösung. In einen Meßkolben von 2 l werden 1360 ccm gesättigte Chlorkaliumlösung eingebracht, dazu 8 ccm 10%ige Kupfer-

sulfatlösung. Anderseits werden 2 g Uranylacetat in 200 ccm Wasser gelöst, 1,2 ccm konzentrierte (spez. Gew. 1,19) Salzsäure zugegeben und diese Mischung ebenfalls in den Meßkolben eingefüllt. Mit destilliertem Wasser wird auf 2000 ccm aufgefüllt. 2. Jodatlösung. 0,3567 g Kaliumjodat (KJO_3) werden in einem Meßkolben von 1 l in Wasser aufgelöst, 10 ccm 20%ige Schwefelsäure (s. 4) zugegeben und auf 1000 ccm aufgefüllt. 3. Alkalilösung. 75 g Kaliumcarbonat normal (K_2CO_3) und 20 g weinsaures Kaliumnatrium (Seignettesalz) werden in Wasser gelöst und das Volumen auf 1000 gebracht. 4. Schwefelsäure 20%ig (aus 80 ccm Wasser und 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure). 5. 5%ige Kaliumjodid-(KJ-)Lösung. 6. 1%ige Stärkelösung öfter frisch herzustellen. Sie darf kein Bakterienwachstum zeigen. In ca. 80 ccm siedendes Wasser wird 1 g lösliche Stärke, die in ca. 10 ccm Wasser aufgeschwemmt war, eingegossen, die Flamme entfernt und die Lösung auf 100 aufgefüllt. 7. $n/_{100}$ Thiosulfatlösung.

Man stellt sich bereit: 1 Gefäß (Reagensglas oder Kölbchen) mit Salzlösung (1), darin eine Pipette von 6,5 ccm Inhalt; ein Gefäß mit Jodatlösung (2), dazu eine genaue Pipette von 2 ccm; eine Bürette mit Alkalilösung, ein Gefäß mit Schwefelsäure, dazu eine 2 ccm Pipette. Jodkalilösung und Stärkelösung hat man für den augenblicklichen Gebrauch zweckmäßig in kleinen Tropfflaschen.

Man beschickt, wie S. 62 beschrieben, mehrere vorher gewogene Blättchen (für jede Bestimmung mindestens 2) mit Blut und bringt sie unmittelbar nach dem Wägen in trockene Reagenzgläser. In jedes Glas gibt man 6,5 ccm der Salzlösung (1) und läßt mindestens ½ Stunde lang extrahieren. Längeres Verweilen bis zu 24 Stunden in der Extraktionslösung schadet nichts, doch werden die Zuckerwerte etwas niedriger. Man gießt dann die Extraktionsflüssigkeit in Jenaer Kölbchen (Kochsche Form) mit ziemlich weitem Halse von ungefähr 100 ccm Fassungsraum ab, bringt in das Reagensglas zum Nachspülen nochmals genau 6,5 ccm Salzlösung und gießt auch diese in das entsprechende Erlenmeyerkölbchen hinein. Man vergesse

nicht, die Kolben zu markieren. [Wenn sehr wenig Zucker erwartet wird, kann man die Extraktionsflüssigkeit aus 2 Reagensgläsern, in deren jedes ein Blättchen hereingetan worden war, in ein Kölbchen zusammengießen und das Nachspülen unterlassen. Man hat dann in dem Kölbchen ebenfalls 13 ccm Lösung und kann nun weiter wie für die zuerst beschriebene Methode verfahren.] Man fügt nun je 2 ccm Jodatlösung (2) (sehr genau!) und Alkalilösung (3) zu und nimmt die Reduktion vor. Der hiezu erforderliche Apparat besteht aus einem Kochkolben (Dampfentwickler) A, der mit einem eingeschliffenen Glasstopfen verschlossen ist (s. Abb. 18), der eingeschmolzen ein zweimal gebogenes Rohr b trägt. Man kann auch einen durchbohrten Gummistopfen verwenden, in welchem das Rohr eingesetzt wird. Der zweite senkrechte Schenkel muß ungefähr 3—4 cm länger sein als die Höhe der benutzten Kölbchen beträgt. Dieser Schenkel trägt an seinem unteren Ende eine kleine Kugel, die seitlich in gleichen Zwischenräumen 3—5 Löcher enthält. Wird in der Flasche A Dampf entwickelt, so geht er durch das Rohr b durch und entweicht in der angeschmolzenen Kugel durch die eingeblasenen Löcher. Zur Vermeidung des Stoßens gibt man trockene Tonstückchen in den Kochkolben A herein. Das Erlenmeyerkölbchen e mit der Versuchsflüssigkeit wird zweckmäßig mit einer Klammer c eingeklammert, die auf einem Stativ leicht herauf- und heruntergeschoben werden kann.

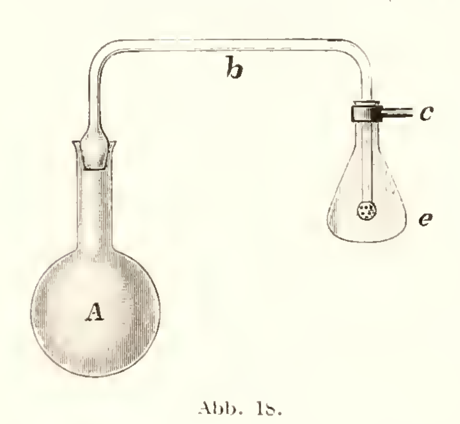


Abb. 18.

Vor Beginn des Versuches wird der Dampfentwickler angeheizt: sobald die Dampfentwicklung regelmäßig geworden ist, wird das Erlenmeyerkölbchen, das bis dahin beiseite gestanden hat, mit Hilfe der Klammer schnell hochgeschoben, bis das Rohr b so tief eintaucht, daß der kugelige Ansatz ganz von der Flüssigkeit bedeckt ist. Die

Zeit wird sofort, am besten mit Hilfe einer Stoppuhr oder Sanduhr, markiert. Durch den einströmenden Dampf wird der Inhalt des Kölbchens in ungefähr 10 Sekunden zum Sieden erhitzt und bleibt dann im dauernden Kochen, das genau 4 Minuten nach dem Einführen (nicht nach Beginn des Siedens der Versuchsflüssigkeit!) unterbrochen wird. Während des Kochens füllt man die 2 ccm Pipette mit 20%iger Schwefelsäure und stellt diese 5 Sekunden vor dem Ablauf der 4 Minuten mit der Füllung in die Versuchsflüssigkeit herein. Das Unterbrechen der Reduktion erfolgt außer durch diese H_2SO_4-Zugabe durch schnelles Fortziehen des Erlenmeyerkölbchens vom Dampfentwickler, indem man es mit Hilfe der Klammer schnell herunterläßt. Man läßt den Inhalt des Kölbchens 5 Minuten erkalten, gibt 20 ccm destilliertes Wasser zu und kühlt dann eine Minute unter fließendem Wasser ab. Die Titration erfolgt mit n/100 Thiosulfatlösung mit Hilfe der Mikrobürette (s. S. 5). Man gibt zur Lösung 10 Tropfen Jodkaliumlösung (5) und 3 Tropfen Stärkelösung (6) und titriert auf einer weißen Unterlage, bis die Blaufärbung gerade verschwunden ist und innerhalb 3 Minuten nicht wiederkehrt.

Anderseits muß ein Leerversuch angestellt werden, in dem man das jodbindende Vermögen der angewandten Reagentien feststellt. Dieser Versuch wird genau so angestellt wie der Vollversuch. Man nimmt nur statt der mit Blut beschickten Blättchen gewöhnliche leere. Dieser Versuch braucht nicht für jede Bestimmung neu ausgeführt zu werden, er muß jedoch mindestens an jedem Versuchstage in zwei Proben gemacht werden, wobei naturgemäß Bedingung ist, daß für alle Versuche dieses Tages dieselben Lösungen, auch die gleiche Thiosulfatlösung, angewandt werden. Stimmen die Werte nicht gut überein, muß wiederholt werden, da der erhaltene Wert grundlegend für die Berechnung ist.

Berechnung: Da bei der Titration mit Thiosulfat das freie Jod bestimmt wird, muß die bei der Leerbestimmung verbrauchte Thiosulfatmenge höher sein als die der Vollbestimmung. Man subtrahiert diesen letzteren Wert von

dem der Leerbestimmung und dividiert die so erhaltene Zahl durch 2,8. Diese Zahl leitet sich daher, daß unter den angegebenen Versuchdbesingungen 2,8 ccm n/100 Thiosulfatlösung 1 mg Glukose entsprechen. Man erhält auf diese Weise die Menge Traubenzucker in der Versuchslösung in Milligramm, unter Berücksichtigung des Gewichtes des angewandten Blutes die Blutzuckermenge in 100 g.

Beispiel: Die Leerbestimmung habe ergeben 1,92 ccm n/100 Thiosulfat, die Vollbestimmung 1,65 ccm Thiosulfat. Die Differenz beträgt 0,27 ccm Thiosulfat. 0,27 : 2,8 = 0,0964; die angewandte Blutmenge enthielt also 0,0964 mg Blutzucker. Waren 86 mg Blut abgewogen, so ergibt sich aus der Gleichung

$$86 : 0{,}0964 = 100 : x$$

der Zuckergehalt in 100 mg Blut zu 0,112 mg, der Zuckergehalt in 100 g Blut also zu 0,112 g bzw. %.

Der Zuckergehalt des normalen Nüchtern-Menschenblutes beträgt 0,08—0,1%.

b) Methode von Hagedorn und Jensen[1]).

Prinzip: Das Blut wird durch eine kolloidale Lösung von Zinkhydroxyd enteiweißt, das klare Filtrat wird mit Ferricyankalium behandelt und das nichtgebrauchte durch Thiosulfat zurücktitriert. Die Reaktion, nach welcher die Umsetzung erfolgt, ist

$$2\,H_3FeCy_6 + 2\,HJ = 2\,H_4FeCy_6 + J_2.$$

Gebrauchte Reagentien: 1. Zinksulfatlösung: Zinksulfat 45 g, in Wasser gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung wird zum Gebrauch auf das 100fache verdünnt. 2. Kaliumferricyanidlösung: 1,65 g Kaliumferricyanid und 10,6 ausgeglühtes wasserfreies Natriumcarbonat werden in Wasser gelöst und im Meßkolben auf 1000 aufgefüllt. Lösung in brauner Flasche aufbewahren. 3. Zinksulfat-Kochsalzlösung: 10 g Zinksulfat und 50 g NaCl

[1]) Biochem. Zeitschr. Bd. 135 (1923).

werden in Wasser gelöst und auf 160 ccm aufgefüllt. 4. Kaliumjodidlösung: 12,5 g KJ werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt (in brauner Flasche aufheben). Zum Gebrauch werden 10 Teile (3) mit 10 Teilen (4) gemischt. Die in dunkler Flasche aufzubewahrende Lösung hält sich nur kurze Zeit: mindestens wöchentlich frisch herstellen! 5. Essigsäurelösung: 3 ccm Eisessig werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. 6. Stärkelösung: 1 g lösliche Stärke wird unter leichtem Erwärmen in ungefähr 5 ccm Wasser gelöst und mit gesättigter NaCl-Lösung auf 100 aufgefüllt. 7. Natriumthiosulfatlösung n/200, hergestellt durch Verdünnen von 5 ccm n/10 Thiosulfat auf 100. 8. Kaliumjodatlösung: 0,3567 g KJO_3 werden in Wasser gelöst und im Meßkolben auf 2000 aufgefüllt. Letztere Lösung dient zur Einstellung des Titers der Thiosulfatlösung (7). Diese Kontrolle ist stets vorzunehmen, so oft eine neue Thiosulfatlösung hergestellt wird, mindestens aber jede Woche. Die Titerstellung erfolgt einfach so, daß 2 ccm Jodatlösung (8) mit 2 ccm Essigsäure (5), 2 ccm der Jodid-Mischung (3 + 4) und 2 Tropfen Stärke (6) versetzt werden und die bis zum Verschwinden der Blaufärbung nötige Menge n/200 Thiosulfat festgestellt wird. 9. NaOH n/10.

Alle Reagentien sind darauf zu prüfen, daß sie eisenfrei sind, sonst sind sie zu verwerfen.

Zur Enteiweißung der Blutproben werden ebensoviel Reagensgläser aus Jenaer- oder Pyrexglas von ungefähr 15 mm Durchmesser und 120 mm Höhe (es können auch andere Formate verwandt werden) mit je 1 ccm n/10 NaOH beschickt und dazu 5 ccm der auf das 100fache verdünnten Zinklösung (1) zugegeben. Es entsteht eine kolloidale Lösung von Zinkhydrat. Ein oder besser zwei Gläschen werden als Kontrollen in der gleichen Weise behandelt. Mit einer Pipette von 0,1 ccm wird aus der Fingerbeere oder aus dem Ohrläppchen 0,1 ccm Blut entnommen, die Pipette von außen anhaftendem Blut gesäubert und der Inhalt in die kolloidale Zinklösung ausgeblasen. Man spült die Pipette mit der im Reagensgläschen befindlichen Mischung durch Aufziehen und Zurückblasen noch 2mal

aus und bläst sie leer. Man stellt nunmehr sämtliche mit Blut beschickten Röhrchen ebenso wie die Kontrollen auf 3 Minuten in ein siedendes Wasserbad. Inzwischen hat man soviel Präparatengläser von ungefähr 30 mm Durchmesser und 100 mm Höhe bereitgestellt, wie der Anzahl der Proben einschließlich Kontrollen entspricht. Diese Gläschen stehen zweckmäßig in einem dazu angefertigten Gestell, das man späterhin zusammen mit den Gläschen in ein Wasserbad stellen kann. Auf die mit den gleichen Zahlen wie die Reagensgläser mit den Proben zu numerierenden Gläschen kommt ein Trichter von ungefähr 4 cm Durchmesser, der einen kleinen Bausch angefeuchteter, entfetteter, reiner Watte oder ein Papierfilter enthält. Man prüfe das Filtermaterial, besonders die Watte, daraufhin, ob es frei von reduzierenden Substanzen ist. Nachdem die Reagensgläser die oben genannten 3 Minuten erhitzt worden sind, gießt man ihren Inhalt auf das dazugehörige Filter, worauf ein ganz klares Filtrat resultieren muß. Man wäscht die Reagensgläser noch zweimal mit je 3 ccm Wasser gut aus und gießt diese ebenfalls auf das Filter. Man läßt gut abtropfen und entfernt die Trichter. Nunmehr wird in jedes Glas einschließlich der Kontrollen mit Hilfe einer Pipette 2 ccm Ferricyanidlösung (2) — sehr genau abzumessen! — zugefügt und das Gestell mit den Gläschen 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad eingebracht. Man läßt abkühlen — die Proben können jetzt auch längere Zeit stehenbleiben — und fügt nun zu jeder Probe 2 ccm der Zinksulfat-Kaliumjodidlösung (Mischung aus 3 und 4), darauf 2 ccm Essiglösung (5) und 2 Tropfen Stärkelösung (6). Man titriert mit der Thiosulfatlösung aus einer Mikrobürette in üblicher Weise bis zum Verschwinden der blauen Farbe, wobei man das Gläschen auf eine weiße Unterlage stellt.

Zur Berechnung muß man kennen: 1. die verbrauchte Thiosulfatlösung a) für die Blutprobe, b) für die Kontrolle; 2. den Titer der Thiosulfatlösung. Hagedorn und Jensen haben eine Tabelle angegeben, aus welcher die dazugehörigen Glukosewerte ohne weiteres abzulesen sind.

ccm n/200 Thiosulfat	mg Glukose in 100 ccm Blut									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

Die bei der Titration mit Thiosulfat erhaltenen Werte werden zunächst mit dem Titer multipliziert, was den wahren Thiosulfatwert ergibt. In der Tabelle sind die Glukosewerte angegeben, welche den Thiosulfatzahlen entsprechen, wobei unter Glukose die gesamte reduzierende Substanz verstanden wird, so daß auch im Leerversuch „Glukose" gefunden wurde. Die Oxydation der reduzierenden Substanz wurde durch Ferricyankalium bewirkt und die hiezu nicht verbrauchte Menge mit Thiosulfat zurücktitriert; aus diesem Grund ist der Thiosulfatwert der Leerprobe höher als der der Vollprobe. Um den Glukosewert des Blutes zu erhalten wird der Glukosewert des Vollversuches von dem des Leerversuches abgezogen. Die Differenz ergibt direkt die mg Glukose in 100 ccm Blut.

Beispiel: Die Einstellung der Thiosulfatlösung mit der Jodatlösung habe ergeben, daß für 2 ccm Jodatlösung

2,04 ccm Thiosulfatlösung verbraucht worden sind. Die Thiosulfatlösung ist demnach etwas zu schwach und man muß, um richtige Werte zu erhalten, die beim Zuckerversuch verbrauchte Thiosulfatmenge mit $\frac{2,00}{2,04} = 0,98$ multiplizieren.

Es sei verbraucht worden im Vollversuch 0,64 ccm. Da diese Zahl mit 0,98 (dem Titer der Thiosulfatlösung) zu multiplizieren ist, ergibt sich als wahrer Verbrauch von Thiosulfat 0,63 ccm. Aus der Tabelle wird der dazu gehörige Wert mit 245 mg abgelesen. Im Leerversuch seien verbraucht worden 1,86 ccm; diese Zahl muß wiederum mit 0,98 multipliziert werden, was 1,82 ccm ergibt. Der dazu gehörige Zuckerwert der Tabelle ist 31 mg Traubenzucker. Die Differenz 245 minus 31 ergibt den Gehalt von 214 mg Traubenzucker in 100 ccm Blut oder 0,214%. Die Ergebnisse sind denen des Bangschen Verfahrens durchaus gleichwertig. Es sei darauf hingewiesen, daß man hier den Blutzucker in 100 ccm bestimmt, nicht wie nach Bang in 100 g. Durch Multiplikation mit 0,95 erhält man den Zuckergehalt in 100 g.

Dresel-Rothmann (Biochem. Zeitschr. 146) haben die Hagedorn-Jensen-Methode mit Aufsaugung des Blutes in Blättchen nach Bang kombiniert. Die in üblicher Weise mit Blut beschickten Blättchen werden nach dem Wiegen mit der Torsionswaage sofort in die kolloidale Zinkhydroxydlösung überführt, 3 Minuten gekocht, und es wird von da an genau so verfahren, wie es für die Original-Hagedorn-Jensen-Methode angegeben ist. Zur Leerbestimmung werden leere Blättchen in gleicher Weise behandelt.

c) Mikromethode nach Folin.

Prinzip: Durch den Zucker wird Ferricyanid zu Ferrocyanid reduziert, das als Berlinerblau kolorimetrisch bestimmt wird.

Reagentien: 1. Enteiweißungslösung: 20 ccm 10%ige Natriumwolframatlösung werden mit Wasser auf ca. 500 ccm verdünnt, hiezu 20 ccm $^{2}/_{3}$ n-H_2SO_4 (S. 90) zugegeben und auf 1000 aufgefüllt. Der Lösung werden

einige Tropfen Toluol zugefügt. 2. Ferricyanidlösung: 1 g umkristallisiertes Ferricyankalium auf 500 ccm Wasser gelöst. 3. Cyanidcarbonatlösung (sehr giftig!): 8 g Natriumcarbonat, wasserfrei, in Wasser gelöst, dazu 150 ccm einer 1%igen Natriumcyanidlösung, auf 500 ccm aufgefüllt. 4. Ferrisulfat-Phosphatlösung: 60 ccm einer Gummiarabicumlösung, hergestellt nach Vorschrift des D. A. B. (1 Teil gepulvertes Gummiarabicum wird bei Zimmertemperatur mit 2 Teilen Wasser versetzt, gut geschüttelt und nach Lösung zur Klärung stehengelassen), werden mit ca. 500 ccm Wasser versetzt. Anderseits werden 5 g Ferrisulfat $[Fe_2(SO_4)_3 + 9 H_2O]$ in 75 ccm Phosphorsäure spezifisches Gewicht 1,70 und 100 ccm Wasser gelöst und zu der anderen Lösung zugefügt. Auffüllen auf 1000[1]. 5. Standard-Stammlösung: 1 g Traubenzucker reinst wird ad 500 ccm in 0,2%iger Benzoesäurelösung gelöst. Wird zum kolorimetrischen Vergleich auf das 200fache bzw. 100fache verdünnt. Die Verdünnung a enthält im ccm 0,01 mg Glukose, Verdünnung b 0,02 mg Glukose. Nur die Stammlösung ist, im Eisschrank aufbewahrt, längere Zeit haltbar. Sie muß von Zeit zu Zeit kolorimetrisch kontrolliert, aber wenn Trübungen auftreten, sofort verworfen werden.

In ein Zentrifugenglas werden mit der Pipette 10 ccm Lösung (1) abgemessen und nun mit einer 0,1-ccm-Pipette aus einem Blutstropfen bis zur Marke Blut aufgesaugt. Nachdem das außen anhaftende Blut abgewischt ist, wird das Blut aus der Pipette in das Zentrifugenglas hereingeblasen und die Pipette durch wiederholtes Aufsaugen und Zurückblasen der Lösung von den letzten Blutspuren gereinigt. Hiedurch erfolgt zugleich eine gute Durchmischung. Der gebildete Eiweißniederschlag wird abzentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit werden 1 ccm in ein graduiertes Reagensglas mit einer Marke bei 25 überführt, dazu 1 ccm Lösung (2) und 1 ccm Lösung (3) aus einer Bürette gegeben. In ein anderes Reagensglas mit Marke bei 25 werden 1 ccm der 200mal verdünnten Stammlösung (5) gegeben, bei hohem Zuckergehalt 1 ccm

[1]) Muß im Eisschrank aufbewahrt werden.

der auf das 100fache verdünnten Stammlösung und ebenfalls je 1 ccm Lösung (2) und Lösung (3) zugefügt. Der Inhalt beider Röhrchen wird gut gemischt und die Röhrchen für 8 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Röhrchen werden durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt, darauf zu jedem Röhrchen 3 ccm Lösung (4) gegeben und nach 5 Minuten zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die blauen Färbungen werden im Kolorimeter in üblicher Weise verglichen.

Berechnung: Bei Anwendung der Vergleichslösung a ergibt sich der Zuckergehalt der Blutprobe zu $0{,}1 \cdot \frac{s_1}{s}$ %— 1 ccm Vergleichslösung enthält 0,01 mg Glukose, 1 ccm der Blutlösung entspricht 0,01 ccm Blut —, bei Anwendung von Vergleichslösung b zu $0{,}2 \cdot \frac{s_1}{s}$ %, wo s_1 die Schichtdecke der Vergleichslösung, s die Schichtdecke der Versuchslösung bedeutet.

Beispiel: Angewandt Vergleichslösung a, Höhe der Schicht der Versuchslösung (s) 30, der Schicht der Vergleichslösung (s_1) 33. Der Blutzuckergehalt beträgt $0{,}1 \cdot \frac{33}{30} = 0{,}11\%$ oder 0,11 g in 100 ccm.

Durch diese neue Methode wird das alte Verfahren nach Folin-Wu in der Regel entbehrlich sein. Es wird nur noch da Anwendung finden, wo man im Rahmen der Folin-Wuschen Methodik nach Enteiweißung mit Wolframsäure die verschiedenen Blutbestandteile bestimmt und dafür sogleich eine größere Menge Blut enteiweißt. Da der Blutzucker aber beim Stehen des Blutes sehr schnell abnimmt, muß man die Enteiweißung sofort nach der Entnahme ausführen, wenn die Werte des Blutzuckers genau sein sollen. Man wird schon aus diesem Grunde die Bestimmung des Blutzuckers nur in seltenen Fällen zusammen mit der der anderen Stoffe ausführen. Es wird darum auf die Wiedergabe der Methode hier verzichtet und auf ihre Darstellung in der 1. Auflage der Mikromethodik S. 122 verwiesen.

Bestimmung der Milchsäure[1]).

a) Kolorimetrische Methode.

Prinzip: Blut wird mit Metaphosphorsäure enteiweißt. Aus der eiweißfreien Lösung werden die Kohlehydrate durch Kupfer-Kalkfällung entfernt und in der zuckerfreien Lösung die Milchsäure durch heiße konzentrierte Schwefelsäure in Acetaldehyd übergeführt. Die auf Zusatz von Veratrol gebildete Rotfärbung wird kolorimetrisch gegen eine auf gleiche Weise behandelte Milchsäurelösung bekannten Gehaltes oder eine empirisch hergestellte Vergleichslösung bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. Metaphosphorsäure, wäßrige 10%ige Lösung, aus glasiger Phosphorsäure (Kahlbaum) herzustellen (2 Tage haltbar). 2. Kupfersulfatlösung kaltgesättigt. 3. Calciumhydroxyd zur Analyse. 4. Konzentrierte Schwefelsäure zur Analyse wasserfrei, frei von Nitrit (von Kahlbaum wird eine konzentrierte Schwefelsäure pro analysi acidi lactici geliefert). Die Schwefelsäure muß folgende Bedingung erfüllen: wird zu 3 ccm 0,1 ccm einer 0,125%igen Veratrollösung (6) zugefügt, so darf sich die Schwefelsäure nicht in einigen Minuten gelbgrün färben. Es ist darauf zu achten, daß die Schwefelsäure in sorgfältig verschlossener Flasche gehalten wird, da sie sonst Wasser anzieht und unbrauchbar wird. 5. Milchsäure-Vergleichslösung: 0,8113 g im Exsikkator getrocknetes, wasserfreies Zinklaktat werden auf 1000 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung enthält in 1000 ccm 0,6 g Milchsäure: sie ist zum Gebrauch auf das 10fache zu verdünnen[2]). 6. Veratrollösung (modifizierte Darstellung nach Lohmann) 0,125 ccm Veratrol werden in ungefähr 5 ccm absolutem, aldehydfreiem Alkohol gelöst und mit Wasser auf 100 aufgefüllt.

Ausführung der Methode: Das Blut wird mit Hilfe einer Spritze aus der ungestauten Vene entnommen, wobei, wenn nicht unter anderen, bestimmten Bedingungen untersucht werden soll, darauf geachtet werden muß, daß der Patient nüchtern und mindestens $^1/_2$ Stunde vorher ganz

[1]) Nach Mendel-Goldscheider.

[2]) Bei geringen Milchsäuremengen verdünnt man die Standardlösung auf das 20fache und setzt bei der Berechnung $c_1 = 30$ mg

ohne körperliche Arbeit gewesen ist. Das ist ebenso bei Tieren zu beachten. Z. B. geben die Zappelbewegungen beim Töten eines Tieres grobe Fehler. Die Tiere müssen daher betäubt werden; Injektion einer Lösung von Morphin-HCl 30 Min. vor Entnahme hat sich für diesen Zweck gut bewährt. 1 ccm Blut wird in ein Reagensglas, das 6 ccm destilliertes Wasser enthält, schnell hereingegeben, gemischt und unmittelbar 1 ccm Metaphosphorsäurelösung (1) hinzugefügt (alle Mengen genau abmessen!). Es wird kräftig umgeschüttelt und nach einigen Minuten durch ein Faltenfilter abfiltriert. Es ist zweckmäßig, den ersten Tropfen des Filtrates in eine 20%ige Sulfosalicylsäurelösung einfallen zu lassen, um gleich zu sehen, ob die Enteiweißung vollständig ist: sonst wird nochmals auf das Filter zurückgegossen. Schneller geht die Verarbeitung mit nachfolgendem Zentrifugieren, wobei man natürlich das Blut sofort in ein mit 6 ccm Wasser beschicktes Zentrifugenglas hineingibt. Von der eiweißfreien überstehenden bzw. filtrierten Lösung werden 1 ccm in einem kleinen Zentrifugenglas mit 1 ccm Kupfersulfatlösung (2) (diese Mengen genau abmessen!) und ca. 1 g Calciumhydroxyd (3) versetzt, und unter wiederholtem Umschütteln 30 Minuten stehengelassen. Nach dieser Zeit wird zentrifugiert.

Von der nunmehr klaren überstehenden Lösung, die absolut zuckerfrei sein muß (Probe: werden unter Schütteln in Eis zu 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure tropfenweise 0,5 ccm der auf Zucker zu prüfenden Lösung zugefügt, das Gemisch dann einige Minuten in siedendem Wasser erhitzt und nach Abkühlen in Eis 0,1 ccm einer Veratrollösung (6) zugefügt, so darf sich keine Rotfärbung entwickeln), werden mit der Pipette 0,5 ccm abgehoben und in ein mit Schwefelsäurebichromat und destilliertem Wasser gereinigtes, absolut trockenes Reagensglas eingebracht. Das Reagensglas wird in eine Eislösung eingetaucht und unter Schütteln 3 ccm Schwefelsäure (4) tropfenweise zugesetzt. Darauf wird die Flüssigkeit genau 4 Minuten in ein siedendes Wasserbad eingebracht und sofort in Eiswasser gekühlt. Zur Kontrolle wurden 2 ccm der auf das 10fache verdünnten Milchsäurelösung (5) mit

12 ccm Schwefelsäure, unter Eiskühlung tropfenweise versetzt und zu gleicher Zeit mit der Probe in siedendes Wasser und von da in Eiswasser gebracht. (Die Lösung muß völlig vom Wasser umspült sein.) Nachdem die beiden Lösungen vollständig abgekühlt sind, wird zu der Versuchslösung 0,1 ccm, zu der Vergleichslösung 0,1 ccm Veratrollösung (6) (diese Mengen genau abmessen!) zugegeben, beide Gläser zur Verteilung des Veratrols kräftig geschüttelt und im Wasserbad von 25° genau 20 Minuten stehengelassen. Nach dieser Zeit wird die Vergleichslösung in den Keil, die Versuchslösung in den Trog des Autenrieth-Kolorimeters eingefüllt und unmittelbar die kolorimetrische Ablesung angeschlossen.

Die Berechnung geht davon aus, daß die Vergleichslösung, bei Berücksichtigung der im Blute vorgenommenen 10%igen Verdünnung, 60 mg Milchsäure auf 100 ccm Blut entspricht.

Auf Grund der wiederholt gebrauchten Formel berechnet sich der Milchsäuregehalt im Blut zu

$$c = 60 \text{ mg} \cdot \frac{s_1}{s} \text{ in } 100 \text{ ccm},$$

wobei s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung (im Autenrieth-Kolorimeter also 100 — abgelesene Zahl) und s die Schichtdicke der Versuchslösung, im Autenrieth-Kolorimeter also 100 bedeutet.

Beispiel: Die Ablesung im Autenrieth-Kolorimeter sei für Farbengleichheit 60. Dann wäre die wahre Schichtdicke 100 — 60 = 40. Der Milchsäuregehalt in 100 ccm Blut ist dann also

$$60 \text{ mg multipliziert} \cdot \frac{40}{100} = 24 \text{ mg in } 100 \text{ ccm}$$

oder 24 mg% Milchsäure.

Mendel und Goldscheider empfehlen für den Keil eine empirische Füllung, die aus einer verdünnten alkoholischen Carbolfuchsinlösung besteht, zu der 1 Tropfen einer stark verdünnten Lösung von Orange G zugefügt worden ist. Die Lösung ist am besten so zu verdünnen, daß sie bei einer Stellung des Keiles bei 0 gleiche Farbe zeigt mit einer in der Art der Versuchsprobe behandelten Milch-

säurelösung, indem 0,5 ccm der 10fach verdünnten Milchsäurelösung (5) genau nach Vorschrift behandelt wurden. Die Färbung des Keiles entspricht dann genau der wie oben beschrieben behandelten Versuchslösung und wird zur Berechnung mit 60 mg% eingesetzt. Zweckmäßig werden durch entsprechende Verdünnung der Standardlösung Vergleichslösungen mit 15 mg% und mit 30 mg% Milchsäure in gleicher Weise hergestellt und eine Kurve angefertigt, indem als Abszisse die im Autenrieth-Kolorimeter gefundenen Skalenteile, als Ordinaten die dazu gehörigen Milchsäurekonzentrationen (mg%) aufgetragen werden. Aus dieser Kurve kann man dann den zu jeder Ablesung gehörigen Milchsäurewert sofort entnehmen, ähnlich wie es bei den für andere Zwecke hergestellten käuflichen Keilen geschieht. Für Serienversuche ist die Anwendung eines solchen, bei guter Paraffinierung ½ Jahr haltbaren Dauer-Keils unerläßlich. Neuerdings werden auch für die Methode adaptierte gefüllte, geeichte Keile in den Handel gebracht.

b) Titrimetrische Bestimmung[1]).

Prinzip: Milchsäure wird in Acetaldehyd überführt und dieser durch im Überschuß vorhandenes $NaHSO_3$ gebunden. Der Überschuß wird bei saurer Reaktion durch J gebunden, dann bei alkalischer Reaktion das dem Acetaldehyd entsprechende $NaHSO_3$ mit Jodlösung titriert.

Erforderliche Reagentien: Die zur Enteiweißung von Blut nach Folin-Wu erforderlichen (S. 90), ferner 1. Saures Mangan-Reagens: In 100 ccm n. H_2SO_4 werden 25 g Mangansulfat gelöst und dazu 250 ccm 1 n. Na_2SO_4-Lösung gegeben (161 g[2]) gelöst in 250 ccm Wasser). 2. $NaHSO_3$-Lösung 1%. 3. n/100 $KMnO_4$-Lösung. 4. 3/10 n-Jodlösung. 5. n/200-Jodlösung. 6. Natriumbicarbonat (Pulver). 7. Stärkelösung 1% in gesättigter Kochsalzlösung. 8. Kupfersulfatlösung 10%. 9. 5%ige Suspension von $Ca(OH)_2$ in Wasser.

Zur Bestimmung dient der in Fig. 19 dargestellte Apparat, der an allen wichtigen Stellen Glasschliffe hat. Der Ab-

---

[1]) Nach W. B. Wendel, Jl. of biol. Chem. **102**, 17/1933.

[2]) $N_2SO_4 + 10H_2O$.

sorptionsturm E hat Einziehungen an zwei senkrecht aufeinander stehenden Ebenen.

Zu je 10 ccm Blutfiltrat nach Folin-Wu, entsprechend 1 ccm Blut werden zur Entfernung der Glucose je 2 ccm Kupferlösung (8) und 2 ccm Ca-Suspension (9) gegeben, gemischt und zentrifugiert. Vom Zentrifugat werden z. B. 10 ccm, entsprechend 0,7 ccm Blut zum Versuch genommen und in den Kochkolben B eingebracht, dazu 20 ccm Wasser — das gesamte Volumen soll 25 bis 30c cm betragen — gegeben und etwas Talk zugefügt; sodann werden 5 ccm Reagens (1) hereingegeben. In das Reservoir A kommen 5 ccm $KMnO_4$-Lösung, in das Absorptionsgefäß D werden 2 ccm Bisulfitlösung eingefüllt. Der Hahn zwischen A und B ist geschlossen. An das obere Ende von E wird ein zu einer Wasserstrahlpumpe führender Schlauch angesetzt und mäßig Luft durch das System gesaugt.

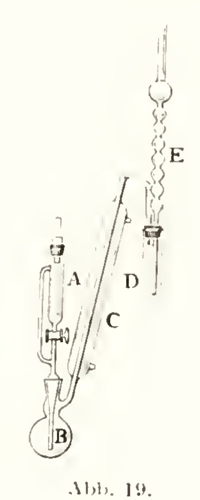


Abb. 19.

Maße des Apparates

Durchmesser des Reservoirs A 19 mm.

Durchmesser des Absorptionsturmes E 10 mm.

Durchmesser des Absorptionsgefäßes D 25 mm

Höhe des Absorptionsgefäßes D 105 mm.

Nachdem der Kühler C angestellt worden ist, wird unter dem Kolben B ein Mikrobrenner angezündet, und der Inhalt des Kolbens zum Sieden erhitzt. Der Stopfen von A wird soweit geöffnet, daß die Permanganat-Lösung langsam eintropft. Unter ständigem Saugen wird 25 bis 30 Minuten erhitzt, dann der Brenner fortgenommen, die Saugung unterbrochen, indem der zur Pumpe führende Schlauch abgenommen wird. Jetzt wird das Absorptionsrohr E von oben zweimal mit je 2 ccm destilliertem Wasser in das Gefäß D herein ausgespült und dieses abgenommen. Die Entfernung des freien Bisulfites geschieht nach Zugabe einiger Tropfen Stärkelösung zunächst mit der stärkeren Jodlösung (4) bis kurz vor Auftreten der bleibenden Blaufärbung, worauf mit der schwachen Jodlösung bis zum

Ende, also bis zur grade bleibenden Blaufärbung titriert wird. Wurde versehentlich übertitriert, werden einige Tropfen verdünnte Bisulfitlösung zugegeben und wieder bis zum Auftreten der Blaufärbung titriert. Nachdem auf diese Weise das überschüssige Bisulfit entfernt worden ist, wird durch Zugabe von einer Messerspitze Natriumbicarbonat (ca. 0,5 g) die Lösung in D alkalisch gemacht, wodurch das durch Acetaldehyd gebundene Bisulfit titrierbar wird. Es wird die nun wieder entfärbte Lösung mit n/200 Jodlösung (5) bis zum Auftreten der Blaufärbung titriert und aus der hiebei verbrauchten Jodmenge die Menge der Milchsäure berechnet.

Berechnung: 4,44 ccm n/200 Jodlösung entsprechen 1 mg Milchsäure, 1 ccm n/200 Jodlösung also 0,225 mg Milchsäure. Bei der Berechnung ist zu berücksichtigen, daß infolge des Zusatzes von Cu und Ca zu der enteiweißten Blutlösung 10 ccm Lösung 0,7 ccm Blut entsprechen.

Beispiel: Enteiweißt 2 ccm Blut. Zu 10 ccm Blutfiltrat je 2 ccm Lösung 8 und 9 zugegeben. Vom Zentrifugat 10 ccm = 0,7 ccm Blut zum Versuch. Verbraucht bei Titration bei alkalischer Reaktion (der Jodverbrauch bei saurer Reaktion ist völlig gleichgültig) 0,65 ccm Jodlösung. Es sind also in 0,7 ccm Blut enthalten 0,65 × 0,225 = 0,146 mg, in 100 ccm Blut 20,9 mg Milchsäure.

Bestimmung der Acetonkörper[1]).

Prinzip: Aus enteiweißtem Blut wird getrennt einerseits präformiertes Aceton und Aceton aus Acetessigsäure und anderseits Aceton aus Oxybuttersäure destilliert und das Aceton jodometrisch bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. Natriumwolframat, 10%; 2. Schwefelsäure $^2/_3$ n; 3. Schwefelsäure, verdünnt (20 ccm konz. H_2SO_4 werden auf 100 ccm verdünnt); 4. Bichromatschwefelsäure (2 g Kaliumbichromat + 20 ccm konzentrierte Schwefelsäure werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt); 5. Natronlauge, 33%ig; 6. n/100 Jodlösung; 7. n/100 Thiosulfatlösung; 8. Stärkelösung, 1%ig.

---

[1]) Z. T. nach Engfeldt.

3—5 ccm unter Zusatz von Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtes Blut (s. S. 60) werden in der S. 90 beschriebenen Art enteiweißt und filtriert. Zur Destillation des Filtrates benutzt man den für die Bestimmung des Acetons im Harn (S. 54) beschriebenen Apparat. 20 ccm des Filtrates, entsprechend 2 ccm Blut, werden in den Destillationskolben eingefüllt und 1 ccm der Schwefelsäure hinzugefügt. Die Auffangegefäße werden beschickt mit je 2 ccm Jodlösung und 2 ccm konzentrierter Natronlauge. Nachdem die Verbindungen fest hergestellt sind, wird unter direktem Erhitzen, wenn nötig, unter Ergänzung des verdampften Wassers durch den Trichter, ein starker Luftstrom durchgesaugt, der während einer Dauer von 25 Minuten unterhalten wird und das gesamte Aceton (präformiertes und aus Acetessigsäure) aus der Lösung mitreißt. Nach Beendigung werden die Auffangegefäße abgenommen, gut verschlossen und 15 Minuten stehengelassen. In diesen Gefäßen hat das freie sowie das aus Acetessigsäure entstandene Aceton Jodoform gebildet. Man schließt nun an den Apparat zwei andere Vorlagen an, welche genau in der gleichen Weise mit Jodlösung und Natronlauge beschickt sind. In das auf seinem Platze gebliebene Destillationsgefäß werden durch den Trichter in vier Portionen in gleichmäßigen Zwischenräumen im ganzen 10 ccm Bichromatschwefelsäure zugesetzt und dabei unter Erhitzen weitere 25 Minuten lang destilliert. Das dabei übergehende und Jodoform bildende Aceton ist aus β-Oxybuttersäure gebildet. Man läßt auch diese Aufnahmegefäße 15 Minuten lang stehen.

Zur Titration wird in das eine Auffangegefäß, dem man den Inhalt des anderen der gleichen Operation zugefügt hat, etwas über 3 ccm Schwefelsäure (3) gefügt, so daß die Lösung deutlich sauer und durch Jodausscheidung bräunlich gefärbt ist. Man fügt einige Tropfen Stärkelösung dazu und titriert mit n/100 Thiosulfatlösung bis zur Farblosigkeit in der wiederholt beschriebenen Weise.

Die Menge des Acetons berechnet sich daraus, daß 1 ccm $^1/_{100}$ Normal-Jodlösung 0,1021 mg Geamtaceton entspricht. Da zur Bestimmung 2 ccm Blut angewendet worden waren (20 ccm Filtrat), so wird die Menge Aceton in 1 ccm durch

Multiplikation der gefundenen Zahl mit 0,0512 in mg erhalten bzw. mit 5,12 auf 100 ccm Blut. (Die Multiplikation mit der Zahl 0,1024 mg statt 0,0967 mg erklärt sich daraus, daß man es mit einer Mischung von präformiertem Aceton und Aceton aus Acetessigsäure zu tun hat.) Das zweite Destillat enthält nach den Versuchen von Engfeldt eine Ausbeute von 69,2% Aceton aus Oxybuttersäure, so daß 1 ccm $^{1}/_{100}$ Normal-Jodlösung 0,25 mg Oxybuttersäure entspricht.

Beispiel: Es seien vorgelegt für die Bestimmung des Gesamtacetons (präformiert und aus Acetessigsäure) 4,0 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 3,2 ccm Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung demnach 0,8 ccm. Das in der destillierten Blutmenge (2 ccm) enthaltene Aceton würde sich also zu 0,8 · 0,1024, also zu 0,0819 mg Aceton berechnen, die Menge des Gesamtacetons (präformiertes und aus Acetessigsäure) in 100 ccm also zu 4,095 mg. Zur Bestimmung des Acetons aus β-Oxybuttersäure seien ebenfalls 4 ccm Jodlösung vorgelegt, zum Zurücktitrieren seien 2,8 ccm Thiosulfat verbraucht. Die Differenz 1,2 · 0,25 mg = 0,3 mg entspricht der Menge Oxybuttersäure in 2 ccm Blut, in 100 ccm Blut sind 15 mg β-Oxybuttersäure enthalten.

Zur Bestimmung der Gesamtacetonkörper des Blutes zusammen (präformiertes Aceton, Acetessigsäure, Oxybuttersäure) erfolgt die Vorbereitung in der gleichen Weise wie oben beschrieben. Die Destillation erfolgt sofort nach Zusatz der Bichromatschwefelsäure. Für die Berechnung ist, wenn man alle Acetonkörper als Acetessigsäure ausdrücken will, die Menge des nicht verbrauchten Jods nach Engfeldt mit 0,22 mg zu multiplizieren.

Beispiel: Vorgelegt wurden 4 ccm Jodlösung, verbraucht zur Titration 2,4 ccm Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung 1,6 ccm. In 2 g Blut sind enthalten 1,6 × × 0,22 mg = 0,352 mg Acetonkörper, in 1 ccm Blut also 0,176 mg, in 100 ccm 17,6 mg Acetonkörper berechnet als Acetessigsäure.

Es ist noch möglich, bei der anfangs beschriebenen Methode das als solches vorhandene von dem aus Acetessigsäure gebildeten Aceton dadurch zu trennen, daß

man zunächst ohne Erwärmen destilliert (präformiertes Aceton) und dann das Aceton aus Acetessigsäure nach Wechseln der Vorlage und Erwärmen der angesäuerten Lösung überdestilliert. (Vgl. auch bei Harn S. 55.) Anstellung eines Leerversuches ist unerläßlich.

Bestimmungen der Fettkörper.

Vorbemerkung. Die meisten Mikro-Fettbestimmungen beruhen auf der Reduktionswirkung der Fette gegenüber Chromsäure. Diese Reaktion ist außerordentlich empfindlich; Täuschungen sind leicht durch andere reduzierende Substanzen, vor allem auch durch den Gefäßen anhaftende Fettspuren möglich. Es ist daher unbedingt erforderlich, daß alle für diese Methoden gebrauchten Gefäße absolut rein, am besten durch heiße Bichromat-Schwefelsäure sorgfältig von allen organischen Substanzen befreit sind. Man läßt die Gefäße in der Bichromat-Schwefelsäure stehen; erst zum Versuch nimmt man sie heraus, spült sie mit destilliertem Wasser gut aus und trocknet sie im Trockenschrank bei 100°.

a) Bestimmung des Gesamtfettes.

Prinzip: Das mit Salzsäure behandelte Blut wird mit Äther extrahiert und im gewaschenen, abgedampften Ätherextrakt oxydometrisch das Fett bestimmt.

Notwendige Reagentien: 1. 1% ige Natronlauge, 2. Normalnatronlauge, 3. Normalschwefelsäure, 4. n/10 Chromsäurelösung mit Schwefelsäure, hergestellt durch Auflösen von 4,9083 g Kaliumbichromat in Wasser, Zugabe von 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure und Auffüllen auf 1000 ccm. 5. Äther puriss. 6. Salzsäure, konzentriert: 1,19. 7. Konzentrierte Schwefelsäure. 8. Jodkalilösung: 5% ig. 9. Thiosulfatlsöung: $^1/_{10}$ normal. 10. Stärkelösung: 1% ig.

Mit einer genauen, 0,1 ccm fassenden Pipette wird dieses Quantum Blut aus der Fingerbeere entnommen und quantitativ in ein mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure gereinigtes und nach Abspülen mit destilliertem Wasser sorgfältig getrocknetes Reagensglas überführt. Man gibt 3 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu und stellt

½ Stunde in ein siedendes Wasserbad. Man läßt abkühlen, verdünnt die Lösung mit 5 ccm Wasser und überführt sie quantitativ in einen ungefähr 30 ccm fassenden Scheidetrichter von langer schmaler Form, spült das Reagensglas noch 2 mal mit zusammen 5 ccm Wasser aus gibt diese auch in den Scheidetrichter hinein. Man bringt in das Reagensglas 10—12 ccm Äther und gießt diese nun auch in den Scheidetrichter. Jetzt wird 2—3 Minuten gut ausgeschüttelt. Sollte beim Stehenlassen sich die ätherische Schicht schlecht von der wäßrigen trennen, indem sich an der Grenze ein ziemlich beständiger Schaum bildet, so läßt man zunächst die Hauptmenge der klaren wäßrigen Schicht ab und bläst dann mit einer kleinen Pipette Luft durch die Flüssigkeit durch, indem man die Pipette mit ihrer Spitze dicht unter die Trennungsschicht führt. Ist die Grenze nun scharf geworden, so läßt man die wäßrige Lösung möglichst vollkommen ab, stellt sie zur Seite und gibt nun zu der im Scheidetrichter zurückgebliebenen ätherischen Lösung ungefähr 10 ccm Wasser. Man schüttelt mit diesem (zur Entfernung eventueller Spuren von Salzsäure) durch, läßt die wäßrige Schicht wieder ab und gießt nun durch die obere Öffnung des Scheidetrichters die ätherische Lösung in einen kleinen Erlenmeyerkolben von 25 ccm Inhalt. Die vorher abgelassene wäßrige Lösung einschließlich des Waschwassers wird nochmals im Scheidetrichter mit 10 ccm Äther tüchtig ausgeschüttelt, die wäßrige Schicht abgelassen, die zurückbleibende ätherische Lösung ebenfalls mit 5 ccm Wasser gewaschen, das Wasser wieder abgelassen und die Ätherlösung in den Erlenmeyerkolben zu der anderen getan. Man erwärmt jetzt auf einem elektrischen Sandbad, bis der Äther vollständig entfernt ist, läßt kurz abkühlen, gibt dann 1 ccm 1%ige Natronlauge dazu und mischt durch leichtes Schütteln gut um.

Man gibt genau 2 ccm Chromsäurelösung und 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu und läßt ½ Stunde lang stehen. Sollte eine vollständige Reduktion der Chromsäure eingetreten sein, was sich durch rein grüne Färbung zeigt, gibt man noch eine genau gemessene Menge nach. Hienach überführt man die Lösung quantitativ unter

Verwendung von 150 ccm Wasser in einen großen Erlenmeyerkolben, fügt 1 ccm (20 Tropfen) Jodkalilösung, nach Umschütteln ferner 3 Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert aus einer Mikrobürette bis zur Entfärbung, bzw. Entstehung eines leicht grünlichen Tones mit n/10 Thiosulfatlösung.

Neben der Vollbestimmung muß, wenigstens einmal am Tage, eine Leerbestimmung ausgeführt werden, indem die zur Verwendung kommende Menge Äther, die ebenfalls im Scheidetrichter mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, auf dem elektrischen Bade abgedampft und dann wie eine richtige Probe behandelt wird. Es ergibt sich hier auch bei sehr reinen Substanzen stets eine gewisse Reduktion.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß 1 mg Fett zur Oxydation 2,45 ccm n/10 Chromsäurelösung verbraucht. Die Menge der zur Oxydation zugesetzten Chromsäurelösung abzüglich der angewandten Thiosulfatlösung entspricht der Oxydation des Fettes. Dieser Wert ist aus dem oben angegebenen Grunde durch 2,45 zu dividieren, woraus sich die mg Fett in der angewandten Menge (0,1 ccm) Blut ergeben. Von dieser Zahl ist die auf gleiche Weise zu berechnende des Kontrollversuches abzuziehen.

Beispiel: Es seien angewandt 0,1 ccm Blut; es seien zugegeben worden 2 ccm Chromsäurelösung, zum Zurücktitrieren seien verbraucht worden 0,96 ccm n/10 Thiosulfat. Die Reduktion des Fettes entsprach also dem Verbrauch von 2,0 — 0,96 = 1,04 ccm n/10 Chromsäurelösung. Diese Zahl dividiert durch 2,45 ergibt 0,425 mg Fett. Der zugleich angestellte Kontrollversuch, bei welchem nur 1 ccm Chromsäurelösung zugegeben worden war, habe verbraucht 0,52 ccm n/10 Thiosulfat. Die verbrauchte Chromsäure betrug also 1,0 — 0,52 = 0,48; entsprechend also 0,48 dividiert durch 2,45 = 0,195 mg Fett. Die Differenz 0,425 — 0,195 = 0,230 mg ist also die Fettmenge in 0,1 ccm Blut: 100 ccm enthalten also 0,230 g = 0,230%.

b) Bestimmung nach Bloor.

Prinzip: Das durch Extraktion zunächst mit Äther-Alkohol gewonnene Fett wird oxydometrisch bestimmt.

Erforderlich: 1. Bichromat-Reagens. 3 g $HgNO_3$ werden in 15 ccm Wasser gelöst, anderseits 3 g Kaliumbichromat in 30 ccm Wasser. Die Lösungen werden zusammengegossen, der Bichromat-Niederschlag abzentrifugiert, Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand 2mal in der Zentrifuge mit Wasser gewaschen. Darauf wird er ohne besondere Trocknung in 500 ccm konzentrierter H_2SO_4 gelöst. 2. Petroläther für Fettbestimmungen, Siedepunkt 43—50 Grad. 50 ccm dürfen beim Abdampfen keinen Rückstand geben. Gewöhnlicher Petroläther muß zur Reinigung fraktioniert destilliert werden, wobei die Fraktion über 60 Grad sofort verworfen wird. Die niedriger siedende Fraktion wird mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeschüttelt und der abgesetzte Petroläther nochmals destilliert. 3. Alkohol-Äther. 3 Teile 95%iger redestillierter Alkohol werden mit 1 Teil redestilliertem Äther versetzt. 4. Natrium-Äthylat. 2—3 g blankes, metallisches Natrium werden vorsichtig unter Kühlung in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst. Die Lösung ist kalt und dunkel aufzubewahren: sobald sie sich gelb färbt, muß sie verworfen werden. 5. n/10 Thiosulfat-Lösung. 6. n-Kaliumbichromat-Lösung. 7. 1%ige Lösung von löslicher Stärke. 8. 10%ige KJ-Lösung.

Da jede Spur Fett, welche sich schon durch Berührung an den Glassachen u. pp. festsetzt, die Bestimmung erheblich stört, müssen die zu benutzenden Glasgeräte, einschließlich der Pipetten und Büretten, vorher gründlich mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure entfettet, sodann wiederholt mit destilliertem Wasser gespült und dann im Trockenschrank getrocknet werden.

In einem Meßkolben von 50 ccm mit Glasstopfen bringt man ca. 40 ccm der Alkohol-Äther-Mischung (3) und läßt in feinem Strahl unter dauerndem Rotieren des Kolbens 2 ccm Plasma oder Serum einfließen, so daß ein feiner, flockiger Niederschlag entsteht. Man stellt dann das Kölbchen in ein siedendes Wasserbad, läßt die Flüssigkeit einige Sekunden kochen, läßt dann abkühlen, füllt mit der Alkohol-Äther-Mischung zur Marke auf, mischt nach Aufsetzen des Stopfens gut durch und filtriert die Lösung durch ein fettfreies Faltenfilter.

Von dem Extrakt gibt eine gemessene Menge, bei normalem Fettgehalt 15 ccm, bei erwartetem höherem Fettgehalt entsprechend weniger, in einen Erlenmeyerkolben von 100 ccm, fügt dazu 2 ccm Natriumäthylat (1) und dampft auf dem Wasserbad ab bis der Alkoholgeruch nahezu verschwunden ist. Der Rest des Alkohols wird durch Einleiten eines leichten Luftstromes entfernt: es muß ein teigiger, aber nicht fester Rückstand resultieren. Man fügt dann 1 ccm verdünnte Schwefelsäure (1 Teil konzentrierter H_2SO_4 + 3 Teile Wasser) hinzu und erhitzt im Wasserbad 1 Minute lang. Zu der noch warmen Mischung fügt man 10 ccm Petroläther, der hiebei zum Sieden kommen muß. Bei der Temperatur des kochenden Wasserbades schwenkt man leicht um und gießt dann die überstehende Flüssigkeit in einen 25 ccm Meßkolben ab. Man wiederholt das Erhitzen und die Extraktion mehrmals mit je ca. 5 ccm Petroläther, wobei das Erlenmeyerkölbchen gut ausgespült werden muß und gießt die Flüssigkeit in den Meßkolben zu der ersten. Man läßt dann auf Zimmertemperatur abkühlen, füllt mit Petroläther bis zur Marke auf, verschließt und mischt.

10 ccm des Extraktes gibt man in ein Erlenmeyerkölbchen mit Glasstopfen von 125 ccm Fassungsraum. Man dampft, natürlich nach Abnahme des Stopfens, vorsichtig im Wasserbad ab und entfernt den Rest des Petroläthers durch einen schwachen Luftstrom. Darauf gibt man unter drehendem Mischen 5 ccm des Reagens (1) und 3 ccm n-Kaliumbichromatlösung hinzu.

Neben dieser Vollprobe ist eine Leerprobe angesetzt worden, welche genau dieselben Lösungen in genau der gleichen Konzentration enthält wie die Vollprobe, natürlich mit Ausnahme des fetthaltigen Blutextraktes. Beide Kolben werden nun leicht verschlossen und in einem elektrischen Ofen von 121 Grad oder in ein Wasserbad von 90 Grad 5 Minuten eingesetzt, damit sie ungefähr die richtige Temperatur annehmen. Man nimmt dann heraus, mischt die beiden Kölbchen durch Drehen gut durch, setzt die Stopfen dann fest auf und bringt sie wieder entweder für 20 Minuten in den elektrischen Ofen, oder 1 Stunde in das Wasserbad. Man nimmt die Kölbchen

dann heraus und gibt sofort, ohne vorheriges Abkühlen, 75 ccm Wasser hinzu.

Jetzt wird jedem Kolben 10 ccm der KJ-Lösung (8) und einige Tropfen Stärkelösung (7) zugegeben, und unter kreisförmiger Bewegung mit n/10 Thiosulfatlösung (5) bis zur Entfärbung bzw. zum Auftreten einer hellen, grünblauen Färbung titriert.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß 1 mg Ölsäure, als hauptsächlichster Repräsentant des Blutfettes, durch 3,61 ccm Bichromatlösung n/10 oxydiert wird. Die Menge der in der Probe vorhandenen Ölsäure ergibt sich aus der Differenz zwischen Leer- und Vollprobe, d. h. also aus der Differenz (Bichromat — Thiosulfat) in der Vollprobe, abzüglich der Differenz (zugegebenes Bichromat — zur Titration gebrauchtes Thiosulfat) in der Leerprobe.

Beispiel: Wurde zur Oxydation 3 ccm n-Bichromat-Lösung = 30 ccm n/10 Bichromatlösung verwandt und bei der Vollprobe zum Zurücktitrieren 24,5 ccm n/10 Thiosulfat verbraucht, so ist die Menge des zur Oxydation erforderlichen Bichromats n/10 5,5 ccm gewesen. Ein Leerversuch habe zur Zurücktitrierung des zugegebenen Bichromates 29,7 ccm Thiosulfat verbraucht, so daß also hier 0,3 ccm zur Oxydation erforderlich waren. 5,5 — 0,3 = 5,2 ccm n/10 Bichromat ist also die zur Oxydation der Ölsäure verbrauchte Menge Bichromat. Da 1 mg Ölsäure durch 3,61 ccm n/10 Bichromat oxydiert wird, so ist die Menge der in der Serumprobe vorhandenen Ölsäure 5,2 : 3,61 = 1,44 mg, wobei sämtliche Fettsäure als Ölsäure gerechnet ist. Das Blutserum war zuerst auf das 25fache verdünnt worden und hievon 15 ccm, die also 0,6 g Blut entsprachen, weiter behandelt worden. Von dieser Menge wurden bei der letzten Manipulation 2/5, d. i. 0,24 g genommen. Die festgestellte Ölsäuremenge fand sich also in 0,24 g und dementsprechend enthielten 100 g Serum 600 mg Ölsäure.

Will man nicht die Fettsäure, sondern den Wert des Fettes wissen, so ist, wenn man das Fett als reines Olein annimmt, der erhaltene Fettsäurewert mit 1,05 zu multiplizieren.

Will man in derselben Portion auch das Cholesterin bestimmen, so verwendet man 10 ccm des Petrolätherextraktes, den man in einen kleinen Erlenmeyerkolben zur Trockne abdampft, wie bei der Fettbestimmung beschrieben wurde. Nach dem Abkühlen nimmt man den Rückstand wiederholt mit Chloroform auf und stellt nach Abdampfen des größten Teiles des Chloroforms, Entwässern durch Natriumsulfat, Filtrieren durch gehärtetes Filter und Auffüllen der Lösung auf 10 ccm die S. 127 beschriebene Reaktion an.

Die Aufnahme zweier oxydometrischer Verfahren ergibt sich daraus, daß die erste sich mir im Laboratorium besonders gut bewährt hat, während an anderen Stellen sich die Bloorsche Methode besonderer Beliebtheit erfreut.

c) Nephelometrische Fettbestimmung[1]).

Prinzip: Die in einer wäßrigen Lösung des verseiften, extrahierten Fettes durch Zusatz von Säure erzeugte Trübung wird mit der einer gleichbehandelten Standardlösung aus Triolein im Nephelometer verglichen.

Gebrauchte Reagentien: 1. Alkohol-Äthermischung, bestehend aus 3 Teilen redestilliertem, absolutem Alkohol und einem Teil reinstem Äther; 2. alkoholische Natronlauge, normal; 3. verdünnte Salzsäure (1 Teil konzentrierte Salzsäure und 4 Teile Wasser); 4. Standard-Oleinlösung: 200 mg Triolein werden in der Alkohol-Ätherlösung (1) in einem Meßkolben von 500 aufgelöst und mit der gleichen Lösung zur Marke aufgefüllt. Die Lösung enthält in 5 ccm 2 mg Triolein. Gut verschlossen aufbewahren, damit nicht durch Abdunstung des Lösungsmittels die Konzentration zunimmt!

In einen Meßkolben von 50 ccm, welcher ungefähr 40 ccm der Lösung 1 enthält und der vorher mit der Lösung, nachdem der Stopfen aufgesetzt war, zu wiegen ist, werden aus einer Spritze ungefähr 2 ccm Blut langsam hereingespritzt, während der Kolben dauernd umgeschüttelt wird. Bei der Einfüllung des Blutes ist darauf zu achten, daß man das Kölbchen nicht mit der warmen Hand anfaßt, um Abdunsten von Äther zu vermeiden. Der Stopfen wird wieder aufgesetzt; der Meß-

[1]) Nach Bloor.

kolben wird wieder gewogen und so das Gewicht des zugegebenen Blutes festgestellt. [Man kann auch das Blut in die alkoholische Ätherlösung — ohne Wägung — mit einer Pipette oder auch einer sehr genau graduierten Spritze hereinbringen und bestimmt in diesem Falle den Fettgehalt in dem gemessenen Volumen. Aus diesem kann man annähernd das Gewicht durch Multiplikation mit 1,05 (mittleres spezifisches Gewicht des Blutes) berechnen.] Man bringt den Kolben in ein kochendes Wasserbad und läßt ihn dort, bis der Inhalt gerade zu sieden anfängt, kühlt dann sofort unter der Wasserleitung ab, füllt mit dem Alkohol-Äthergemisch bis zur Marke auf und mischt gut durch. Man filtriert nun schnell die Lösung durch ein Faltenfilter in ein trockenes Gefäß, wobei darauf zu achten ist, daß kein Verlust an Lösungsmittel durch Wärme entsteht. An warmen Tagen muß daher das zur Aufnahme der Lösung benutzte Gefäß in kaltes Wasser gestellt werden. Es ist darauf zu halten, daß alle diese Manipulationen bei einer gleichbleibenden Temperatur erfolgen und möglichst schnell ausgeführt werden.

Von dem Filtrat bringt man in zwei kleine Bechergläschen oder weithalsige Erlenmeyerkölbchen von ungefähr 50 ccm Fassungsraum einen aliquoten Teil herein. Im allgemeinen wird sich bei der Anwendung von ungefähr 2 ccm Blut 15 ccm als die richtige Menge erweisen. Man fügt zu jeder Probe 2 ccm der alkoholischen Natronlauge (2) und läßt auf einem elektrischen Bade oder einem Sandbade die Mischung abdampfen, bis alles Lösungsmittel verdampft und die Verseifung vollzogen ist.

Inzwischen hat man drei Kölbchen von ungefähr 200 ccm Fassungsraum mit je 100 ccm reinem destillierten Wasser beschickt. Man löst nun den Rückstand in den kleinen Kölbchen in je 5 ccm der Alkohol-Ätherlösung unter leichtem Erwärmen auf, so daß nur noch einige Flocken des Natriumhydrats ungelöst bleiben, und bringt den Inhalt unter Umrühren in je eins der mit Wasser beschickten Kölbchen: die kleinen Gläschen werden durch Zurückgießen von etwas Lösung aus den großen Kölbchen noch einmal ausgespült und der Inhalt wieder in

den betreffenden Kolben zurückgegossen. (Die Doppelanalyse empfiehlt sich, um das Resultat sicher zu gestalten.) In das dritte Kölbchen mit Wasser gibt man 5 ccm der Standardlösung (1) herein und mischt auch dieses Kölbchen durch leichtes Umschwenken. Nach ungefähr 5 Minuten gibt man in jedes Kölbchen 10 ccm der Salzsäure (3), mischt durch leichtes Schütteln und schließt nach 5 Minuten langem Stehen den nephelometrischen Vergleich an, der in weiteren 5 Minuten beendet sein muß.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß in der angewandten Kontrollösung 2 mg Triolein enthalten sind. Die Menge des in der angewandten Probe enthaltenen Fettes entspricht also: 2 mg multipliziert mit $\frac{s_1}{s}$, worin s_1 die Schichthöhe der Vergleichslösung, s die der Versuchslösung bedeutet.

Beispiel: Es seien durch Wägung 1,8 g Blut festgestellt worden. Von diesen, die zunächst auf 50 ccm aufgefüllt waren, sind 15 zur Analyse verwandt worden. Die nephelometrirche Bestimmung habe ergeben für s_1 30, für s 40 mm. Es berechnet sich also die Menge des in den 15 ccm der Extraktlösung befindlichen Fettes zu 2 mg multipliziert mit $\frac{30}{40} = 1{,}5$ mg, die Menge des in den gesamten 50 ccm Extrakt, also der angewandten Blutmenge vorhandenen Fettes zu 1,5 mal $\frac{50}{15} = 5{,}0$ mg Fett. Da die Blutmenge 1,8 g betrug, so ergibt sich die Menge des Fettes in 100 g nach der Gleichung 1,8 : 5 = 100 : x zu 278 mg oder 0,278%.

Wenn man das Blut abmißt, erhält man natürlich die Werte für das betreffende Volumen; will man sie daraus auf das Gewicht umrechnen, so muß man durch 1,05 dividieren.

Bestimmung des Cholesterins.

Die Bestimmung beruht auf der Farbreaktion des Cholesterins mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure

und dem kolorimetrischen Vergleich mit einer bekannten Lösung.

Erforderliche Reagentien: 1. Kalilauge 25%; 2. Chloroform; 3. Natriumsulfat, wasserfrei; 4. Essigsäureanhydrid $(CH_3CO)_2O$; 5. Schwefelsäure konzentriert; 6. Cholesterin-Vergleichslösung: 100 mg Cholesterin werden mit Chloroform auf 250 ccm gelöst. Zum Versuch wird diese Lösung auf das 5fache mit Chloroform (z. B. 5 ccm ad 25 ccm) verdünnt. Diese letztere Lösung enthält 2 mg in 25 ccm, sie entspricht für die angegebenen Versuchsbedingungen einem Cholesteringehalt von 200 mg in 100 ccm Serum.

1 ccm Serum (mit einer genauen Pipette entnommen) werden in ein großes Jenaer oder Pyrex-Reagensglas eingebracht, 10 ccm 25%ige Kalilauge zugefügt, und nach Umschütteln das Reagensglas in ein kochendes Wasserbad eingestellt. Nach 2—3 Stunden langem Kochen läßt man abkühlen und gießt dann die Mischung in einen kleinen, ungefähr 30 ccm haltenden Scheidetrichter länglicher Form hinein. Man spült das Gefäß mit 10 ccm Chloroform aus und gibt dieses ebenfalls in den Scheidetrichter hinein. Man schüttelt kräftig aus, läßt sich die beiden Schichten trennen und läßt dann die untere Chloroformschicht in ein trockenes Kölbchen ab. (Vorher Stopfen abnehmen!) Zu der im Scheidetrichter zurückgebliebenen Flüssigkeit gibt man ungefähr 8 ccm Chloroform, schüttelt wieder gut durch und gibt das abgesetzte Chloroform zu dem abgelassenen. Man wiederholt die Prozedur mit ca. 8 ccm Chloroform nochmals und vereinigt den Chloroformextrakt mit den anderen. Um die fast immer trübe Chloroformlösung vom trübenden Wassergehalt zu befreien, gibt man in das Kölbchen ca. 5 g wasserfreies Natriumsulfat und schüttelt energisch durch. Die so wasserfrei gemachte Chloroformlösung wird durch ein trockenes Filter in ein trockenes 25-ccm-Meßkölbchen filtriert, das Kölbchen mit etwas frischem Chloroform nachgewaschen, dieses ebenfalls durch das Filter gegossen und das Meßkölbchen mit Chloroform bis zur Marke aufgefüllt.

Es wird an einem Teil dieser natürlich gut durchzumischenden Chloroformlösung die Farbenreaktion angestellt. Bei Benutzung des Autenriethschen Kolorimeters, wo die Versuchslösung in den Trog eingefüllt wird, genügen 5 ccm Chloroformlösung, bei Anwendung eines größeren Kolorimeters werden im allgemeinen 20—25 ccm erforderlich sein. Die Mengenverhältnisse für die weitere Verarbeitung sind entsprechend zu nehmen. Zu je 5 ccm Chloroformlösung werden 2 ccm Essigsäureanhydrid und 3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und das Gefäß im Dunkeln 15 Minuten bei 32—35 Grad stehengelassen. In dieser Zeit hat sich die Färbung optimal entwickelt. Zum Vergleich kann man entweder den für das Autenriethsche Kolorimeter hergestellten Farbkeil verwenden, oder — das ist für den Leerkeil des Autenriethschen Apparates wie für die anderen Kolorimeter erforderlich —, man muß zu gleicher Zeit wie im Chloroform-Blutextrakt in der Vergleichslösung die Farbreaktion ausführen. Bei Benutzung des „Autenrieth" gibt man zu 10 ccm der verdünnten Vergleichslösung 4 ccm Essigsäureanhydrid und 6 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure. Benutzt man Kolorimeter mit größerem Fassungsvermögen, muß man entsprechend größere Mengen nehmen. Die Lösung bleibt mit der anderen zusammen 15 Minuten bei 32—35 Grad im Dunkeln stehen. Der kolorimetrische Vergleich wird in üblicher Weise durchgeführt.

Die Berechnung erfolgt bei Verwendung des Autenriethschen Kolorimeters und des fertigen Farbkeiles durch Ablesen der Skala und Aufsuchen des entsprechenden Wertes in einer beigegebenen Tabelle[1]). Bei Verwendung einer nach obiger Vorschrift angefertigten Vergleichslösung ergibt sich für diese ein Cholesteringehalt von 2 mg in 25 ccm. Bei Farbengleichheit bei gleicher Schichtdicke würde also die Versuchslösung in 25 ccm, bzw. der darin enthaltene 1 ccm Serum ebenfalls 2 mg Cholesterin enthalten, 100 ccm Serum also 200 mg. Sind die Schichtdicken bei gleicher Farbtiefe verschieden, so berechnet sich der Cholesterin-

[1]) Sind dort andere Verdünnungsverhältnisse angegeben, so sind die Werte entsprechend zu reduzieren.

wert nach der wiederholt angewandten Formel $c = \frac{c_1 \cdot s_1}{s}$.
Der Cholesteringehalt in 100 ccm Serum ist demnach 200 mg multipliziert mit dem Quotienten

$$\frac{\text{Schichtdicke der Testlösung}}{\text{Schichtdicke der Versuchslösung}}.$$

Für stärkere Cholesterinkonzentrationen verwendet man eine Lösung von 4 mg Cholesterin in 25 ccm Chloroform, die genau auf die gleiche Weise behandelt wird; man verdünnt also die Stammlösung auf das Zweieinhalbfache: also 10 ccm Stammlösung + 15 ccm Chloroform. Bei der Berechnung ist dann statt 200 mg 400 mg einzusetzen.

Beispiel: Angewandt 1 ccm Serum, Chloroformextrakt 25 ccm, behandelt wie oben angegeben, Vergleichslösung 2 mg Cholesterin in 25 ccm Chloroform. Die kolorimetrische Ablesung ergibt für die Vergleichslösung eine Schichtdicke von 20 mm, für die Versuchslösung eine solche von 25 mm bei Farbengleichheit. Der Cholesteringehalt der Lösung ergibt sich für 100 ccm Blut zu

$$\frac{20 \cdot 200}{25} = 160 \text{ mg Cholesterin.}$$

Der Cholesteringehalt des normalen Blutes beträgt ungefähr 160—180 mg%.

Bestimmung der Harnsäure[1]).

a) Methode von Folin und Wu.

Prinzip: Harnsäure wird in der enteiweißten Blutlösung zusammen mit den Chloriden durch Silber gefällt, aus dem Niederschlag die Harnsäure durch HCl-haltige Kochsalzlösung herausgelöst und mit Hilfe des Folinschen Harnsäurereagens die freigesetzte Harnsäure kolorimetrisch bestimmt.

Nötige Reagentien: 1. Zur Enteiweißung (Wolframsäure) die bei Reststickstoff S. 90 angegebenen; 2. 5%ige Lösung von Silberlaktat in 5%iger Milchsäure; 3. 10%ige

[1]) Für die diagnostische Verwertung der Harnsäurewerte beim Menschen (besonders zur Diagnose der Gicht) soll der Patient 3 Tage vorher purinfrei ernährt sein. Am 4. Tag ist das Blut nüchtern zu entnehmen.

NaCl-Lösung in n/10 HCl; 4. 5%ige Natriumcyanidlösung (giftig, Vorsicht!); 5. Natriumcarbonatlösung 20%ig; 6. Natriumsulfitlösung 10%ig; 7. Harnsäurereagens nach Folin: 100 g Natriumwolframat werden mit 80 ccm 85%iger Phosphorsäure (spez. Gew. 1,70) und 750 ccm Wasser 3 Stunden (unter dem Abzuge!) unter Ersatz des verdampften Wassers gekocht, nach dem Abkühlen wird auf 1 l aufgefüllt; 8. Harnsäurestandardlösung. Durch Lösen von 200 g Natriumsulfit und Auffüllen mit Wasser auf 1 l wird eine 20%ige Na_2SO_3-Lösung hergestellt, die man zum besseren Absetzen über Nacht stehen läßt und dann zum Entfernen etwaiger Trübungen noch filtriert. Man löst 100 mg reinste Harnsäure (genau auf der chemischen Waage wiegen) in 15 ccm einer 0,4%igen Lithiumcarbonatlösung und bringt diese Lösung quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen 1000-ccm-Meßkolben. Man gibt hiezu noch ca. 300 ccm Wasser, ferner 500 ccm der 20%igen Natriumsulfitlösung (die nicht gebrauchte 20%ige Na_2SO_3-Lösung verdünnt man mit der gleichen Menge destillierten Wassers und gewinnt so die Lösung Nr. 6) und füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf. Nach gutem Durchmischen füllt man die Lösung in saubere trockene Flaschen von 200 ccm ab, verkorkt sie gut und überzieht Kork und Flaschenhals mit Paraffin, indem man diese Teile in geschmolzenes Paraffin eintaucht. Die so verschlossene Lösung hält sich einige Monate; wenn sie zum Gebrauch öfter geöffnet wird — bei dieser Flasche braucht man die Paraffindichtung nicht immer zu wiederholen —, bleibt sie ungefähr 4 Wochen lang unverändert.

Man enteiweißt mindestens 5 ccm Blut in der S. 90 angegebenen Weise. Man pipettiert 20 ccm des Blutfiltrates in ein großes Zentrifugenglas hinein, fügt 4 ccm Silberlaktatlösung (2) dazu, rührt gut um und zentrifugiert 5—10 Minuten in einer gut laufenden Zentrifuge. Durch Zusatz eines Tropfens Ag-Lösung zu der klaren überstehenden Flüssigkeit prüft man, ob noch eine Fällung entsteht — bejahenden Falles werden noch 2 ccm Silberlösung zugegeben, umgerührt und nochmals zentrifugiert. Entsteht keine Fällung mehr, was die Regel ist, so gießt

man die überstehende Flüssigkeit ab, was ohne Schwierigkeit gelingt, da der Niederschlag fest am Boden haftet. Man fügt nun zu diesem 2 ccm der Kochsalzlösung (3), ungefähr 10 ccm Wasser, rührt wieder gut um und zentrifugiert. Die Harnsäure geht hiebei in die überstehende klare Flüssigkeit. Man bringt diese nun, vom Bodensatz abgießend, quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen Meßkolben von 25 ccm. Sollte sich etwas Chlorsilber ablösen und mithereingehen, so schadet dies nichts, da es wieder gelöst wird. Man fügt nun noch hinzu 1 ccm Natriumsulfitlösung (6), 0,5 ccm Cyannatriumlösung (4) — aus einer Bürette zu entnehmen, sehr giftig, darum nicht mit einer Pipette aufsaugen! — und 3 ccm Natriumcarbonatlösung (5).

Anderseits werden zwei Vergleichslösungen hergestellt. In je einen Meßkolben von 50 ccm Inhalt werden eingefüllt

	in Kolben a	Kolben b
Standardlösung (8)	1 ccm	2 ccm
Natriumsulfitlösung (6)	1 ccm	—
Kochsalzlösung (3)	4 ccm	4 ccm
Cyannatriumlösung (4)	1 ccm	1 ccm
Natriumcarbonatlösung (5)	6 ccm	6 ccm

Beide Kölbchen werden mit destilliertem Wasser auf ungefähr 15 ccm aufgefüllt und gut durchgemischt. Man gibt dann zu gleicher Zeit zu Kolben a und b je 1 ccm, in das 25 ccm Kölbchen, welches die Versuchslösung enthält, 0,5 ccm Harnsäurereagens (7), mischt, läßt 10 Minuten stehen, füllt dann mit Wasser bis zur Marke auf und mischt wieder. Man nimmt sofort die kolorimetrische Ablesung vor, indem man hiebei zum Vergleich die Standardlösung benutzt, die etwas dunkler ist als die zu untersuchende Lösung.

Die Berechnung ergibt sich aus folgendem. Vergleichslösung a enthält in 50 ccm 0,1 mg Harnsäure, in 100 ccm 0,2 mg Harnsäure, die Lösung b in 100 ccm 0,1 mg Harnsäure. Die 25 ccm der zu untersuchenden Lösung entsprechen 2 ccm Blut, 100 ccm dieser Lösung würden also 8 ccm Blut entsprechen. Würde also bei dem kolorimetrischen Vergleich eine Farbengleichheit der beiden

Lösungen bestehen, wenn beide gleiche Schichtdicke haben, so würde bei Vergleich der Versuchslösung und der Testlösung a auch die Blutlösung 0,2 mg Harnsäure in 100 ccm Lösung oder in 8 ccm Blut enthalten. Der Harnsäuregehalt in 100 ccm Blut wäre dann 12,5mal so hoch und entspräche in diesem Falle 2,5 mg Harnsäure in 100 ccm Blut. Würden die gleichen Verhältnisse, d. h. Farbengleichheit bei gleicher Schichtdicke, bei Anwendung der Testlösung b sich ergeben, so wäre die in 100 ccm Blut enthaltene Harnsäuremenge 5 mg. Bei Farbengleichheit und verschiedener Schichtdicke ergibt sich der Harnsäuregehalt in 100 ccm Blut unter Anwendung der oben erwähnten Formel

bei Anwendung von Testlösung a zu $\frac{s_1}{s} \cdot 2{,}5$ mg,

bei Anwendung von Testlösung b zu $\frac{s_1}{s} \cdot 5$ mg Harnsäure,

wobei wiederum s_1 die Schichtdicke der Testlösung, s die Schichtdicke der zu untersuchenden Lösung bedeutet.

Beispiel: War Testlösung a angewandt, und betrug bei gleicher Farbtiefe die Schichtdicke dieser 20 mm, die Schichtdicke der Versuchslösung 27,5 mm, so waren enthalten in 100 ccm Blut

$$\frac{20}{27{,}5} \cdot 2{,}5 = 1{,}82 \text{ mg Harnsäure.}$$

Der Harnsäuregehalt im normalen Blute beträgt bei purinfreier Ernährung zwischen 1,5 und 3 mg%.

b) Verbesserte Bestimmung nach Benedict[1]).

Prinzip: Vorhandensein von Thionein gibt z. B. nach der alten Methode von Benedict (5. Aufl. Mikromethodik, S. 159) um 0,5—1,5 mg% zu hohe Werte. Die neue Methode schaltet diesen Fehler aus.

Erforderliche Reagentien: 1. Wolfram-Molybdän-Reagens. 10 g reinste, NH_3-freie Molybdän-Säure werden mit 50 ccm n/1 NaOH 5 Minuten langsam gekocht. Es wird filtriert, das Filter mit 150 ccm heißem Wasser nach-

---

[1]) Nach Benedict. Jl. biol. chem. Bd. 92.

gewaschen und zum erkalteten Filtrat eine Lösung von 80 g Natriumwolframat in 600 ccm Wasser gegeben. Dann auf 1000 auffüllen. 2. 0,62 n-H_2SO_4-Lösung: 620 n-H_2SO_4 im Meßkolben auf 1000 aufgefüllt. Aus diesen beiden Lösungen wird die verdünnte Fällungslösung (3) hergestellt. 3. 10 ccm Lösung (1) werden in einen 250 ccm-Kolben pipettiert, mit ca. 100 ccm Wasser verdünnt; hiezu 10 ccm Lösung (2), dann aufgefüllt zur Marke und gemischt. Die Lösung ist 3—5 Tage haltbar. 4. Lithiumchlorid-Lösung. 1,5 g Lithiumchlorid in Wasser gelöst, 10 ccm konzentrierte Salzsäure (1,19) zugegeben und auf 250 aufgefüllt. 5. Silbernitratlösung. 5,8 g $AgNO_3$ werden in Wasser gelöst und auf 250 aufgefüllt. 6. Natriumcyanid-Lösung. 50 g Cyannatrium werden mit Wasser ad 1000 ccm gelöst und der gesamten Lösung 2 ccm konzentriertes Ammoniak zugefügt. Sehr giftig! Nicht pipettieren! ca. 6 Wochen haltbar. 7. Harnsäure-Reagens. 100 g reines Natriumwolframat wird in ca. 600 ccm Wasser gelöst und dann 50 g reine Arsensäure (As_2O_5), darauf 25 ccm 84%ige Phosphorsäure und 20 ccm konzentrierte Salzsäure zugegeben. Man kocht 20 Minuten, läßt abkühlen und füllt auf 1000 ccm auf. Reagens ist unbeschränkt haltbar. 8. Harnsäurestandard-Lösung. a) Stammlösung. 9 g sekundäres Natriumphosphat (Na_2HPO_4) und 1 g primäres Natriumphosphat (NaH_2PO_4) werden in ungefähr 200—300 ccm heißem Wasser gelöst, wenn nicht ganz klar, filtriert und die Lösung auf 500 ccm aufgefüllt. 0,2 g reinste Harnsäure, genau abgewogen, werden in ein großes Becherglas überführt und durch Zugabe von 5—10 ccm Wasser aufgeschwemmt. Die noch heiße Phosphatlösung wird jetzt schnell auf die Suspension unter leichtem Schütteln heraufgegossen, wobei die Harnsäure vollständig in Lösung geht. Man läßt erkalten, fügt 1,4 ccm Eisessig hinzu, bringt die gesamte Lösung in einen Meßkolben und füllt mit Wasser bis zur 1000 ccm-Marke auf. b) Gebrauchsfertige Standardlösung: 1 ccm der Stammlösung (a) werden in einen 500 ccm-Meßzylinder einpipettiert, ca. 300 ccm Wasser und darauf 5 ccm konzentrierte Salzsäure zugegeben und schließlich mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung enthält in 500 ccm 0,8 mg Harn-

säure und entspricht bei den gewählten Versuchsbedingungen 1 mg% Harnsäure im Blute.

5 ccm der verdünnten Fällungslösung (3) werden in ein kleines Zentrifugenglas einpipettiert. Mit einer genauen Pipette werden 0,2 ccm Blut aufgesaugt, die Pipette gut außen abgewischt, der Inhalt in die Lösung hereingeblasen und die Pipette durch zweimaliges Hochziehen und Zurückblasen der Lösung im Zentrifugenglas gut ausgespült. Das Reagensglas wird nochmals gut durchgeschüttelt, bzw. der Inhalt mit einem kleinen Glasstab durchmischt und nach kurzem Stehen zentrifugiert. 1 ccm der klaren überstehenden Flüssigkeit werden in ein anderes kleines Zentrifugenglas überführt, dazu 1 ccm der Lithiumlösung (4) gegeben, gemischt und 1 ccm Silberlösung (5) zugefügt. Nach gutem Durchmischen wird wieder zentrifugiert und danach die gesamte überstehende Flüssigkeit in ein Reagensglas abgegossen. Anderseits wurden 1 ccm der gebrauchsfertigen Standardlösung (8b) in ein anderes Reagensglas einpipettiert und 2 ccm Wasser zugegeben. In jedes Röhrchen kommt jetzt (aus einer Bürette, Vorsicht!) 2 ccm Cyanidlösung (6) und 0,5 ccm Harnsäurereagens (7). Nach Mischen werden beide Gläser 3 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad gestellt, danach etwas abkühlen gelassen und noch warm im Kolorimeter verglichen. Ablesen nach völliger Abkühlung gibt gleiche Werte, doch tritt dann bisweilen eine Trübung auf, welche die Ablesung unmöglich macht.

Die verdünnte Standardlösung ist so hergestellt, daß bei den gewählten Versuchsbedingungen die Konzentration der Vergleichslösung in der kolorimetrischen Formel zu 1 mg% einzusetzen ist. Ist also wie stets s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung, s die der Versuchslösung bei Farbengleichheit, so berechnet sich die Menge der Harnsäure in 100 ccm Blut zu $\frac{s_1}{s} \cdot 1$ mg in 100 ccm Blut oder zu $\frac{s_1}{s} \cdot 1$ mg%.

An Genauigkeit steht die Methode von Folin-Wu der von Benedict voran; die für die kolorimetrische Analyse verwendeten Phosphorwolframsäure, Arsenphosphor-

wolframsäure und andere ähnliche Verbindungen sind nicht für den Nachweis eines bestimmten Körpers spezifisch: sie reagieren mit Blaufärbung mehr oder weniger auf alle reduzierenden Substanzen. In diesem Sinne muß z. B. bei der Benedictschen Probe ein höherer Glukosegehalt des Blutes berücksichtigt werden. Bei der Folin-Wu-Probe fällt dieser Fehler fort, da die Harnsäure vorher isoliert wurde und sie allein auf das Reagens wirkt. Trotzdem ist für klinische Zwecke die Benedictsche Methode durchaus verwendbar und empfehlenswert.

Bestimmung des Kreatins und Kreatinins.

Prinzip: In dem durch Enteiweißung mit Trichloressigsäure gewonnenem Blutfiltrat wird die durch Zusatz von Pikrinsäure erhaltene Färbung kolorimetrisch bestimmt und so das Kreatinin ermittelt; im anderen Teile des Filtrats wird unter erhöhtem Druck das Kreatin in Kreatinin verwandelt und darauf die Summe von Kreatin + Kreatinin in gleicher Weise kolorimetrisch bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. Trichloressigsäure, 20%ige Lösung. 2. 1%ige Pikrinsäure (aus reinster, eventuell wiederholt umkristallisierter Pikrinsäure herzustellen, in dunkler Flasche aufzubewahren). 3. Natronlauge: 10%ig. 4. Kreatininstandardlösung: 0,1 g reinstes Kreatinin wird unter Zusatz von 10 ccm n/10 HCl in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung ist gut verschlossen lange Zeit unverändert haltbar. Zum Versuch wird hieraus (jedesmal frisch) eine 20fache Verdünnung hergestellt, indem 5 ccm auf 100 ccm verdünnt werden. 100 ccm dieser Lösung enthalten 5 mg Kreatinin, 1 ccm 0,2 mg. Man kann auch von Kreatininchlorzink ausgehen, indem man zur Herstellung der Standardlösung 0,1611 g in gleicher Weise in 100 ccm löst.

(Herstellung des Kreatininchlorzinks s. 2. Aufl. S. 95.)

In einem Zentrifugenglas werden 6 ccm Serum mit 2,4 ccm Wasser gemischt und tropfenweise unter Umrühren 3,6 ccm Trichloressigsäure (1) zugefügt. Es wird zentrifugiert und die erhaltene klare Lösung (ungefähr 9 ccm) abgegossen. Zur Bestimmung des Kreatinins werden 4 ccm in einen Meßkolben oder Meßzylinder a, der eine

Marke bei 15 ccm hat, hereinpipettiert. Andere 1 ccm werden in ein zweites Röhrchen b, das ebenfalls eine Marke bei 15 ccm besitzt, eingebracht und, nachdem die Öffnung mit etwas Zinnfolie verschlossen worden ist, in einen Autoklaven von mindestens 5 Atm. Arbeitsdruck eingebracht und in diesem 30 Minuten auf 135 Grad (= 3 Atm.) erhitzt. (Nicht vergessen, in den Autoklaven Wasser einzufüllen!) Man läßt abkühlen und nimmt die Lösung in dem Gläschen aus dem Autoklaven heraus. Ein drittes Röhrchen c mit derselben Einteilung wird mit 1 ccm der verdünnten Kreatininstandardlösung mit einem Gehalt von 0,2 mg Kreatinin beschickt und hiezu 1,2 ccm Trichloressigsäurelösung (1) zugegeben. Zu allen drei Röhrchen werden nunmehr je 5 ccm einer frisch hergestellten Mischung aus 25 ccm Pikrinsäurelösung (2) und 10 ccm Natronlauge (3) zugefügt. Nach 5 Minuten langem Stehen werden alle Röhrchen mit Wasser auf 15 ccm aufgefüllt, gemischt und im Kolorimeter miteinander verglichen.

Beispiel: 1. Bestimmung des Kreatinins: in den einen Trog kommt die Testlösung (aus c), in den anderen die in gleicher Weise behandelte, nicht erhitzte Blutlösung (aus a). Es bestehe Farbengleichheit beim Stande der Versuchslösung von 60, der Vergleichslösung von 15. Entsprechend der Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wo c_1 die Konzentration der Vergleichslösung (0,2 mg), s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung (15), s die Schichtdicke der Versuchslösung (60) bedeutet, ergibt sich die gesuchte Konzentration zu $0{,}2 \cdot \frac{15}{60} = 0{,}05$ mg. Da diese der Gehalt von 1 ccm Versuchslösung = 2 ccm Serum ist — durch die Enteiweißung war das Serum auf das Doppelte verdünnt worden —, berechnet sich der Gehalt in 100 ccm Serum zu $0{,}05 \cdot 50 = 2{,}5$ mg Kreatinin.

Bei der Bestimmung des Gesamtkreatinins (präformiertes Kreatinin + Kreatinin aus Kreatin) sei bei Anwendung der gleichen Kontrollösung (man läßt diese zweckmäßig einfach in ihrem Trog im Kolorimeter stehen, da im Laufe einer halben Stunde eine Farbenveränderung

nicht eintritt) die Schichtdicke der Vergleichslösung 30, die der Blutlösung (aus b) 24 bei Farbengleichheit. Nach der obengenannten Formel ergibt sich die Konzentration des Kreatinins dieser Probe sinngemäß zu $0{,}2 \cdot \frac{30}{24} = 0{,}25$ mg Gesamtkreatinin. Die Menge in 100 ccm Serum wird, wie oben ausgeführt, durch Multiplikation mit 50 erhalten, so daß in 100 ccm 12,5 mg Gesamtkreatinin (Kreatinin präformiert + Kreatinin aus Kreatin) enthalten sind. Die Menge des Kreatinins aus Kreatin ergibt sich aus der Differenz der beiden Werte zu 10 mg%. Will man das Kreatin berechnen, so muß letzterer Wert mit 1,27 multipliziert werden, woraus sich also ein Kreatingehalt von 12,7 mg ergibt.

Im normalen Blut der Erwachsenen beträgt der Gehalt an Kreatinin 1—2 mg%, an Kreatin + Kreatinin (Gesamtkreatinin) 5—6 mg%.

Bestimmung des Glutathions[1]).

Prinzip: Das mit Sulfosalicylsäure enteiweißte Blut wird mit Jodat titriert.

Erforderlich: 1. Kaliumoxalatlösung, 30%ig. 2. Sulfosalicylsäurelösung, annähernd molar: 25 g Sulfosalicylsäure in Wasser auf 100 ccm. Hieraus wird 2 a) eine 4%ige Lösung hergestellt, indem 45,6 ccm mit Wasser auf 250 ccm verdünnt werden. 3. Jodkalilösung 5%ig: darf kein freies Jod enthalten. 4. 1%ige Lösung von löslicher Stärke. 5. Kaliumjodatlösung. 0,1783 g KJO_3 in 1000 ccm Wasser gelöst, ergibt eine 0,005 n-Lösung. Zur Titration wird, mindestens jede Woche frisch, eine 0,001 n-Lösung hergestellt, indem 50 ccm der 0,005 n-Lösung und 22,8 der molaren Sulfosalicylsäurelösung (2) auf 250 ccm im Meßkolben verdünnt werden.

Mit einer Spritze, welche einen Tropfen der Oxalatlösung (1) mit ungefähr 0,04 ccm enthält, werden 3 ccm Blut aus der Vene entnommen und sehr schnell in ein Kölbchen, welches 24 ccm destilliertes Wasser enthält, eingespritzt. Durch Aufziehen von Wasser aus dem Kölb-

---

[1]) Nach Woodward und Fry, Jl. of biol. Chem. Bd. 97, 465.

chen und Zurückspritzen wird die Spritze ausgespült. Durch leichtes Schütteln wird die Hämolyse des Blutes vervollständigt. Nach 5—10 Minuten gibt man unter leichtem Schütteln 3 ccm der Sulfosalicylsäurelösung (2) dazu, mischt durch und filtriert durch ein trocknes Filter.

Zur Bestimmung des reduzierten Glutathions bringt man 10 ccm des Filtrates in einen 50 ccm Erlenmeyer-Kolben, gibt dazu 2,5 ccm der verdünnten Sulfosalicylsäurelösung (2 a), 2,5 ccm Jodkalilösung (3) und 2 Tropfen der Stärkelösung. Man titriert aus einer Mikrobürette mit der 0,001 n Jodatlösung bis zur Blaufärbung. Der Erlenmeyer-Kolben steht dabei in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 19 bis 20 Grad mit weißem Untergrund, so daß der Farbumschlag sehr leicht erkennbar ist.

Berechnung: Bei Benutzung der 0,001 n Jodatlösung ist für 1 mg Glutathion 3,26 ccm erforderlich. Da 10 ccm Blutfiltrat = 1 ccm Blut angewandt wurden, ergibt sich die Menge des Glutathions hierfür aus der verbrauchten Jodatmenge dividiert durch 3,26, der Wert in 100 ccm Blut durch Multiplikation dieses Bruches mit 100.

Zur Bestimmung des gesamten Glutathions ist das in oxydierter Form vorhandene zunächst zu reduzieren. Hiezu gibt man zu dem Rest des bei der Enteiweißung gewonnenen Filtrates 30—40 mg Zinkstaub, läßt 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen und filtriert dann durch ein trocknes Filter. Von diesem Filtrat werden 10 ccm in der oben angegebenen Form weiter behandelt.

Berechnung erfolgt in gleicher Weise wie oben. Man erhält das gesamte, in reduzierter und oxydierter Form vorhandene Glutathion. Die Differenz zwischen diesem Wert und dem ohne Reduktion ermittelten ergibt das in oxydierter Form vorhandene Glutathion.

Beispiel: 3 ccm Blut wie angegeben behandelt. Für 10 ccm Filtrat wurden 1,34 ccm 0,001 n Kaliumjodat verbraucht. Das in diesen 10 ccm bzw. 1 ccm Blut enthaltene Glutathion ist 1,34 : 3,26 = 0,41 mg oder 41 mg%. Für Titration von 10 ccm nach Zinkstaub-Behandlung (gesamtes Glutathion) waren verbraucht 1,53 ccm; es

waren also vorhanden 1,53 : 3,26 = 0,47 mg in 1 ccm Blut bzw. 47 mg%. Der Gehalt an oxydiertem Glutathion war also 6 mg%.

Bestimmung des Gallenfarbstoffes[1]).

Prinzip: Die Methode beruht auf der Enteiweißung des Serums mit Alkohol, wobei der Farbstoff in letzteren übergeht. Durch Zusatz von Diazoreagens wird eine Rotfärbung erzeugt, welche kolorimetrisch mit einer Standardlösung verglichen wird.

Erforderliche Reagentien: 1. Alkohol, 99%ig. 2. Diazoreagens. Dieses wird hergestellt durch Mischung von 10 ccm Diazoreagens I (1 g Sulfanilsäure wird in Wasser gelöst, 15 ccm Salzsäure, spezifisches Gewicht 1,19, zugesetzt und auf 1 l aufgefüllt) und 0,3 ccm Diazoreagens II (0,5 g Natriumnitrit werden in 100 ccm destillierten Wassers gelöst). Die Mischung ist stets frisch zu bereiten. Sie darf keinen Überschuß an salpetriger Säure enthalten. Kontrolle: Es darf mit JK-Stärke keine direkte Blaufärbung auftreten. 3. Vergleichslösung: 2 g wasser- und nickelfreies Kobaltsulfat werden in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst. Wasserhaltiges Kobaltsulfat (die käuflichen Präparate sind in der Regel wasserhältig) wird durch Erhitzen zur schwachen Rotglut vom Kristallwasser befreit. Diese Farblösung entspricht einem Bilirubin-Gehalt von 0,5 mg in 100 ccm.

Die Gallenfarbstoffprobe wird, wenn nur kleine Quantitäten Serum zur Verfügung stehen, am besten mit Hilfe des Autenriethschen Kolorimeters ausgeführt; werden andere Kolorimeter benutzt, welche größere Mengen beanspruchen, so sind die angegebenen Quantitäten entsprechend zu vervielfachen.

Man bringt in ein kleines Zentrifugenrohr 1 ccm klares Serum (bei sehr gallenstoffreichen Seris oder Duodenalsaft mit hohem Farbstoffgehalt eine Verdünnung 1 + 2 oder 1 + 1 0,9%iger Kochsalzlösung), gibt dazu 2 ccm Alkohol und mischt durch leichtes Neigen. Steht sehr wenig Serum zur Verfügung, kann man auch mit den

[1]) Nach Hijmans van den Bergh.

halben Mengen auskommen. Der Alkohol koaguliert das Eiweiß; man zentrifugiert stark, so daß die überstehende Flüssigkeit möglichst klar wird. Man entnimmt dann von dieser mit einer Pipette 1 ccm, bringt ihn direkt in den Trog des Autenriethschen Kolorimeters, fügt dazu 0,25 ccm der Diazoreagensmischung (2) und gibt noch 0,5 ccm Alkohol dazu. Dieser Zusatz löst die Fettsäuren auf, die in vielen Fällen die Flüssigkeit leicht trüben. Man erhält eine rote Färbung. Gelegentlich, besonders bei höherer Azidität der Mischung, geht diese in kürzerer oder längerer Zeit von Rot in Blauviolett über. In diesem Falle gibt man ganz wenig alkoholische Ammoniaklösung zu, wodurch die Farbe wieder rein rot wird. Man macht den kolorimetrischen Vergleich gegenüber der in den Leerkeil des Autenriethschen Kolorimeters eingefüllten Standardlösung (3) und berechnet nun aus dieser den Bilirubinwert des Serums auf Grund folgender Überlegung.

Durch den Zusatz von 2 ccm Alkohol zu 1 ccm Serum wurde das Volumen der Flüssigkeit annähernd auf das Dreifache gebracht, in Wirklichkeit nur auf $^{20}/_{7}$ des ursprünglichen Volumens, wenn man die Kontraktion berücksichtigt, die durch Zusatz des Alkohols entstand. Das Präzipitat ist so gering, daß es vernachlässigt werden kann, wie bei allen Enteiweißungen. Von diesem Volumen wurde 1 ccm genommen, der durch den Zusatz von 0,25 ccm Diazoreagens und 0,5 ccm Alkohol auf 1,75 ccm, also auf $^{7}/_{4}$ weiter verdünnt wurde. Wir haben also zwei Verdünnungen ausgeführt, als deren Produkt $\left(\frac{20}{7} \cdot \frac{7}{4}\right)$ eine 5fache Verdünnung resultiert. Würde bei gleicher Schichtdicke also gleiche Farbtiefe bestehen, so würde der Gehalt des Troges mit der Versuchsflüssigkeit an Bilirubin $^{1}/_{200000}$ oder 0,5 mg in 100 ccm entsprechen, der Gehalt des Serums, von dem man ausgegangen ist, dem 5fachen dieses Wertes, also $^{1}/_{10000}$ oder 2,5 mg in 100 ccm. Findet sich gleiche Farbtiefe bei einer anderen Stellung des Keiles, so ist diese Zahl mit dem Quotienten $\frac{\text{Schichtdicke der Vergleichslösung}}{\text{Schichtdicke der Versuchslösung}}$ zu multiplizieren. Ver-

wendet man das Autenriethsche Kolorimeter in der gewöhnlichen Form, so ist die Schichtdicke der Versuchslösung mit 100 anzusetzen, die Schichtdicke der Vergleichslösung mit 100—n, wobei n die Ablesung an der Skala des Apparates bedeutet, welche bei gleicher Farbtiefe angezeigt wird. Hat der Apparat Korrekturen, und entsprechen die Werte nicht genau, so sind diese Korrekturen natürlich zu berücksichtigen. Bei obiger Berechnung ist vorausgesetzt, daß der Autenriethsche Apparat bei einer Schichtdicke gleich der des Troges die Ablesung 0, bei geringster die Ablesung 100 gibt. Es gibt auch fertig geeichte Keile, bei deren Benutzung man den Gallenfarbstoffgehalt auf einer mitgegebenen Tabelle ablesen kann.

Beispiel: Es seien angewandt 1 ccm Serum, in der oben beschriebenen Weise behandelt, als Vergleichslösung die ebenfalls beschriebene Kobaltsulfatlösung. Gleiche Farbtiefe im Autenriethschen Kolorimeter sei erreicht bei einer Skalenablesung von 60. Es ergibt sich dann die Konzentration des Bilirubins im Serum zu

$$0,5 \cdot \frac{100 - 60}{100} \cdot 5 = 1 \text{ mg in } 100 \text{ ccm.}$$

Handelt es sich um Sera oder Duodenalsäfte, die außerordentlich reich an Bilirubin sind, so mußte man, ehe man die Enteiweißung und die weitere Behandlung vornimmt, mit 0,9%iger NaCl-Lsg. auf das Doppelte oder das Mehrfache des Volumens genau verdünnen; der erhaltene Wert ist dann noch mit dieser Verdünnungszahl zu multiplizieren. Der Gallenfarbstoffgehalt des normalen Blutes liegt unter 0,5 mg%.

Die Methode gibt alles im Serum enthaltene Bilirubin an: es sei jedoch bemerkt, daß Hijmans van den Bergh durch eine qualitative Probe zwei Arten der Bilirubinreaktion unterscheidet: es spricht von einer „direkten" Reaktion, wenn bei Verdünnung des Serums mit der doppelten Menge Wasser und Zusatz von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Vol. Reagens eine Rotfärbung sofort, höchstens in 30 Sekunden auftritt, und einer „indirekten Reaktion", wo diese erst nach 2—4 Minuten beginnt und erst nach längerer Zeit ihre größte Intensität erreicht. Diese Reaktion tritt

ebenso wie die „direkte" fast momentan und maximal unter Zusatz von Alkohol auf: bei der beschriebenen quantitativen kolorimetrischen Prüfung bestehen also diese Unterschiede nicht. Die qualitative „direkte" Reaktion ist typisch für Sera von Patienten mit Stauungsikterus, während alle anderen Sera von Menschen mit lokal gebildetem Bilirubin die „indirekte" Reaktion geben.

Bestimmung des Indikans.[1])

Diese Bestimmung ist durchaus keine quantitative, genügt aber für die klinische Bewertung vollauf. Sie beruht auf der Bildung von Indolignon, das in der enteiweißten Serumlösung durch Thymol + Obermeyers Reagens erzeugt wird.

Erforderlich: Trichloressigsäure 20%ig. 2. Thymolspiritus: 5%ige Lösung in 95%igem Alkohol. 3. Obermeyers Reagens: zu 250 ccm konzentrierter HCl (spezifisches Gewicht 1,19) wird ca. 1 g Eisenchlorid (Fe_2Cl_6) zugegeben.

Serum wird durch Zusatz der gleichen Menge von Trichloressigsäurelösung (1) enteiweißt und von der durch Filtration oder Zentrifugieren gewonnenen Lösung eine Reihe mit verschiedenen Mengen hergestellt. Diese wird je nach dem erwarteten Indikangehalt abgestuft; bei erwarteten geringen Mengen macht man eine Reihe von 6, 5, 4, 3, 2, 1 ccm, bei erwarteten großen Mengen beginnt man schon mit niederen Konzentrationen, z. B. 2 ccm und dehnt die Reihe, eventuell durch Zwischenschaltung vieler Stufen bis 0,1 ccm aus. Jedes Röhrchen wird nun mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt, gemischt und 1 ccm Thymolspiritus (2) und 10 ccm Obermeyers Reagens (3) zugegeben. Nach jeder Zugabe ist kräftig zu schütteln. Bei Anwesenheit von Indikan bildet sich der rosa-violett gefärbte Farbkörper. Nach 2stündigem Stehen werden alle Gläser mit je 2 ccm Cloroform gut ausgeschüttelt und nach Absetzen der Schichten die Chloroformlösung auf ihre Färbung geprüft. Nach Jolles tritt eine Färbung noch dann auf, wenn sich in 10 ccm der untersuchten Flüssigkeit noch 0,0032 mg Indikan befinden.

[1]) Nach Rosenberg.

Diese Tatsache dient zur Berechnung: es ist in der Blutmenge, welche gerade noch die Reaktion gab, 0,0032 mg enthalten.

Beispiel: Enthält das Röhrchen mit 6 ccm Serumfiltrat, entsprechend also 3 ccm Serum, gerade die durch Rosafärbung angezeigte geringste Menge, so beträgt die Menge des Indikans 0,0032 mg in 3 ccm bzw. in 100 ccm 0,107 mg = 0,107 mg%.

Eine Fehlerquelle ist durch Anwesenheit größerer Mengen Jod gegeben, welches ebenfalls mit violetter Farbe in das Chloroform übergeht. Die Probe ist daher bei gleichzeitiger oder kurz vorhergegangener Jodmedikation nicht brauchbar.

Mikromethodik der anorganischen Analyse in Geweben und festen Ausscheidungen.

Während es bei Harn und Blutserum in fast allen Fällen möglich ist, anorganische Bestandteile durch Fällung direkt zu bestimmen, muß bei der Verarbeitung festen Materials, seien es Ausscheidungen, wie Fäces, seien es Gewebe irgendwelcher Art, der Bestimmung eine Veraschung vorausgehen. Diese Veraschung muß eine solche sein, daß hiebei die zu bestimmenden Substanzen nicht flüchtig fortgehen und daß sie außerdem in einen löslichen Zustand überführt werden, der eine weitere Verarbeitung gestattet. Dementsprechend wird sich die Verarbeitung verschieden gestalten, ob man es mit solchen zu bestimmenden Ionen zu tun hat, die bei der Veraschung entweichen würden, oder ob diese auch bei der eingreifenden Verarbeitung in der Lösung zurückbleiben.

Die Mikrobestimmung anorganischer Substanzen in den genannten Materialien besitzt die gleichen Vorteile wie die im Harn und Blut: man kommt mit sehr geringen Materialmengen aus, was gerade für experimentelle Versuche, aber auch z. T. für klinische Untersuchungen, beispielsweise von exzidiertem Material, einen erheblichen

Vorteil bedeutet, der Verbrauch an Reagentien ist gering, die Dauer der Analyse gegenüber den Makrobestimmungen erheblich verkürzt, ohne daß die Genauigkeit leidet. Die in folgendem zu schildernden Methoden haben im allgemeinen einen Fehler von höchstens 1—2%, was nicht schlechter ist als bei Verarbeitung großer Mengen.

Für die Bestimmung der Alkalien und Erdalkalien eignet sich besonders gut die feuchte Veraschung mit Salpetersäure und Wasserstoffsuperoxyd. Die Menge des angewandten Materials hängt ab von der verfügbaren Menge einerseits, von dem Gehalt an Mineralsubstanzen andererseits. Vorteilhaft wählt man so viel Material, daß es ungefähr 50—80 mg Mineralbestandteile enthält. Wenn man den Aschengehalt von Organen — als ganz rohen Durchschnittswert — zu 1% annimmt, so wird ungefähr 5 g, eventuell etwas mehr, als günstige Menge gelten dürfen. Man kann direkt von den feuchten Rohmaterialien ausgehen, wird natürlich in manchen Fällen, besonders wenn man auch den Wassergehalt bestimmen will, außerdem in den Fällen, wo man eine Durchschnittsprobe von einer größeren Menge verarbeiten will, zunächst trocknen und die getrocknete Masse, wenn sie in der betreffenden Größenordnung ist, in toto verarbeiten, größere Mengen Trockensubstanz aber sehr gut pulvern und davon eine Durchschnittsprobe nehmen, im allgemeinen $^1/_3$ der Menge, welche man von der wasserhaltigen Substanz anwenden würde.

Handelt es sich um kleinere, vollständig zu analysierende Organe bzw. Organteile oder ähnliches, bei denen eine Bestimmung des Wassergehaltes nicht nötig ist, verfährt man am besten folgendermaßen. Man bestimmt das Gewicht eines Wägegläschens, das verhältnismäßig reichlich groß sein muß, bringt dann in dieses das betreffende Material herein, wägt wieder und bestimmt so sein Gewicht. Man übergießt im Wägegläschen selbst das Organ mit so viel rauchender Salpetersäure, daß die Substanz davon vollständig bedeckt ist und kann nun das Gläschen längere Zeit so stehen lassen, mindestens aber über Nacht, wenn es sich nicht um ganz kleine, schnell zerfallende Organteile handelt. Man überführt dann den Inhalt des Wäge-

gläschens — das Organ hat sich vollständig in der Salpetersäure gelöst, wenn es sich nicht gerade um Knochensubstanz oder ähnliches handelt — in einen Jenaer- oder Pyrex-Mikrokjeldahlkolben von ungefähr 100 ccm Inhalt, spült das Gläschen mit wenig Perhydrol gut aus und gibt die Lösung zu dem übrigen in das Jenaer Kölbchen herein. Meist erfolgt jetzt eine ziemlich starke Gasentwicklung, die aber nach kurzer Zeit sistiert. Es ist zu bemerken, daß einzelne Perhydrolpräparate zur Haltbarmachung anorganische Zusätze (z. B. Phosphor) enthielten; die neuen Präparate sind davon augenscheinlich frei, doch ist jedenfalls darauf zu achten. Nach beendeter Gasentwicklung setzt man das Kölbchen auf das Verbrennungsgestell und erhitzt vorsichtig zunächst mit kleiner Flamme, um ein eventuelles Überschäumen zu vermeiden; man steigert dann die Temperatur, und erhitzt so lange, bis der Inhalt des Kölbchens fast, aber nicht ganz trocken geworden ist. Sollten gelegentlich kleine Entzündungen auftreten, so ist das auf die Bestimmung ohne Einfluß. Man läßt etwas abkühlen, gibt von neuem 1—2 ccm konzentrierte Salpetersäure und ungefähr 1 ccm Perhydrol dazu, erhitzt wieder und dampft wieder ebenso weit, wie vorher beschrieben, ab. Diese Prozedur wird so oft wiederholt, bis der anfänglich schwarze oder braune Rückstand verschwunden ist und nur eine helle Masse im Kolben zurückbleibt. Sollte sich im Laufe der Arbeit an der starken Entwicklung von braunen, nitrosen Dämpfen zeigen, daß noch reichlich Salpetersäure vorhanden ist, genügt es auch, das eine oder andere Mal nur Perhydrol und keine Salpetersäure zuzufügen. Ist die Veraschung nun vollendet, muß noch die eventuell vorhandene freie Salpetersäure vertrieben werden. Man läßt abkühlen, gibt ungefähr 25 ccm Wasser und 2—3 Tropfen verdünnte Salzsäure hinzu und dampft auf ungefähr 5 ccm ein. Es dürfen keine gelben Dämpfe mehr aufsteigen, die Lösung darf auch nicht mehr nach Salpetersäure riechen, sonst ist dieses Verfahren nochmals zu wiederholen. Zu bemerken ist, daß eine gelbliche Färbung unter Umständen auch von Eisen herrühren kann. In diesem Falle nützt natürlich weiteres Eindampfen nichts mehr. Die mit Salzsäure

versetzte Lösung ist im übrigen klar, da sich die Chloride der Alkalien und Erdalkalien in Wasser klar lösen; auch kleine Mengen Calciumsulfat, wie sie in Organen gelegentlich vorhanden sein können, bleiben gelöst. Trübungen können herrühren von Kieselsäure, die unter Umständen aus dem Glas aufgenommen sein kann, doch wird dies nur gelegentlich beobachtet. Man überführt nun die schwach salzsaure Lösung quantitativ in ein Meßgefäß entsprechender Größe; am zweckmäßigsten wird es bei den genannten Verhältnissen sein, auf 25 ccm mit destilliertem Wasser aufzufüllen, um die zu bestimmenden Ionen nicht in zu großer Verdünnung zu haben. Sind ihre Mengen verhältnismäßig hoch, wird man geringere Mengen der Aschenlösung zur Analyse verwenden. Bei Material, welches sehr arm an Salzen ist, wird man die Aschenlösung noch weniger verdünnen und unter Umständen mit Vorteil nur auf 10 ccm auffüllen. Die auf solche Weise erhaltenen Aschenlösungen sind naturgemäß unbeschränkt haltbar. Sie genügen, um die verschiedenen Bestimmungen sogar in Doppelanalysen auszuführen. Sie dienen zur Bestimmung von Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Phosphor (beachte aber die eventuell durch Perhydrol gegebene Fehlerquelle!) und Eisen, wenn solches vorhanden.

Die zur Analyse kommenden Organe sollen möglichst blutfrei sein, damit durch die Mineralbestandteile des Blutes keine Fehler erzeugt werden.

Handelt es sich nur um die Bestimmung einzelner Ionen, z. B. Kalium oder Calcium und Magnesium, kann man die Substanz direkt im Zentrifugenrohr veraschen. Man bringt die abgewogene Menge in ein passendes Zentrifugenglas aus Jenaer Glas, übergießt mit Salpetersäure, fügt nach völliger Lösung und Beruhigung des Prozesses Perhydrol dazu und setzt das Gläschen, soweit es gefüllt ist, in ein Sandbad. Man erhitzt dieses auf 160—180°, gibt in Zwischenräumen wieder Perhydrol bzw. Salpetersäure zu, und erhitzt weiter, bis die Veraschung beendet ist. Man verjagt nach Zugabe von Wasser und einigen Tropfen Salzsäure die überschüssige Salpetersäure und kann dann in der Lösung sofort das betreffende Kation,

z. B. Kalium oder Calcium, nach den nachfolgend beschriebenen Regeln ausfällen.

Bestimmung des Wassergehaltes.

Man wiegt, wie S. 65 angegeben, ein Wägegläschen ab, bringt die Substanz herein, wiegt wieder, trocknet darauf im Trockenschrank bei 100°, bis die Masse trocken erscheint, und läßt im Exsikkator abkühlen. Man wägt nach Aufsetzung des Deckels, verteilt, wenn nötig, die Substanz etwas mit einem feinen Messer, damit nicht im Inneren sich Teile der Trocknung entziehen, bringt wieder in den Trockenschrank und wägt nochmals nach Abkühlen im Exsikkator. Das wird solange fortgesetzt, bis das Gewicht konstant bleibt. Der Wassergehalt berechnet sich auf einfache Weise aus den Gewichten vor und nach dem Trocknen.

Die Bestimmung des Natriums

erfolgt in der Aschenflüssigkeit nach der S. 28 für den Harn angegebenen Methode.

Bestimmung des Kaliumgehaltes

geschieht durch Ausfällung der Kalium-Kobaltnitritverbindung in gleicher Weise wie für den Harn (S. 29) beschrieben. Da auch Ammoniumsalze die gleiche Reaktion geben, muß das bei der Verbrennung aus Stickstoffsubstanz gebildete Ammoniak zunächst entfernt werden. Die günstigste K-Menge zur Analyse sind 0,25—0,3 mg. Man nimmt demnach im allgemeinen 0,5—1 ccm der Aschenlösung zur Analyse: im Muskelgewebe beträgt z. B. der Kaliumgehalt im Durchschnitt 3 g in 1000 g frischer Substanz, so daß bei Anwendung von 5 g Substanz in der auf 50 ccm aufgefüllten Aschenlösung ca. 15 mg, in 1 ccm also ungefähr 0,3 mg K enthalten ist. Ist der Kaliumgehalt größer, wird der Niederschlag zu groß; man wird dann zur Analyse noch weniger, z. B. 0,5 ccm verwenden. Zur Entfernung des Ammoniaks gibt man zu der in das Zentrifugenglas hereingebrachten Aschenlösung 1—2 Tropfen m-Nitrophenollösung und fügt nun tropfenweise 2 n-Natronlauge hinzu, bis die Lösung deutlich

gelb geworden ist. Die Natronlauge muß natürlich kaliumfrei sein. Man bringt dann das Zentrifugenglas in ein siedendes Wasserbad, bis ein darüber gehaltener angefeuchteter Streifen von rotem Lackmuspapier nicht mehr gebläut wird, was im allgemeinen nach 3 bis 5 Minuten erreicht ist. Man läßt abkühlen und gibt tropfenweise, bis zum Verschwinden der Gelbfärbung, n/5 Schwefelsäure dazu. Die so erhaltene Lösung wird mit Kobaltnitritreagens versetzt, wie für die Bestimmung des Kaliums im Harn bzw. Serum beschrieben worden ist. Man zentrifugiert nach 1 Stunde Stehen gut ab und gießt die überstehende Flüssigkeit vorsichtig ab. Man fügt nun wieder ungefähr 3 ccm Wasser dazu, ohne den Niederschlag stark aufzurühren, zentrifugiert wieder, gießt ab und wiederholt dies so oft, bis die überstehende Flüssigkeit farblos ist. Nach dieser Zeit gießt man wieder ab und macht die Titration in derselben Weise, wie bei Blut angegeben. Man macht nur den einen Unterschied, daß man, je nach der Menge des Kaliums, n/50 oder n/100 Lösungen verwendet, da bei größeren Kaliummengen, wie sie in manchen Organen vorkommen, der Zusatz von n/100 Permanganat die Flüssigkeitsmenge zu groß machen würde. Man soll als Regel nehmen, daß nicht mehr als 5—7 ccm Permanganat verbraucht werden sollen. Zusatz von Schwefelsäure (1 ccm 20%ig) und Erhitzen im Wasserbad erfolgt in der früher geschilderten Weise. Zum Rühren während des Titrierens wird sehr zweckmäßig die schon an früherer Stelle angegebene Methode der Luftdurchleitung verwendet, da man hiedurch die Hände vollständig frei hat und die Mischung noch besser erfolgt als mit einem Rührer. Achten muß man darauf, daß auf Zusatz von Permanganat und Schwefelsäure der Niederschlag des Kaliumkobaltnitrits sich vollständig löst und ferner, daß die Rotfärbung, d. h. in Wirklichkeit eine schwache Rosafärbung 1 Minute lang bestehenbleibt. Ein sehr einfacher Test hiefür besteht darin, daß man nach der Ablesung und dem Warten noch einen Tropfen Permanganatlösung hinzufügt, wodurch eine deutlich rötere Färbung entstehen muß.

Die Berechnung erfolgt genau in der gleichen Weise, wie an anderer Stelle beschrieben worden ist; 1 ccm ver-

brauchte 1/100 Permanganatlösung entspricht 0,071 mg Kalium. Man berechnet also aus den angewandten ccm n/100 Permanganat vermindert um die angewandten ccm n/100 Oxalsäure (die Lösungen müssen natürlich genau aufeinander stimmen) multipliziert mit 0,071 den Kaliumgehalt in mg für die angewandte Menge und daraus entsprechend für die Gesamtmenge bzw. in Prozenten der angewandten Substanz. Verwendet man n/50 Lösungen, so erfolgt sinngemäß die Berechnung durch Multiplikation mit 0,142 zum Erhalt der mg Kalium für die angewandte Menge.

Bestimmung des Calciums.

Diese erfolgt sinngemäß in der gleichen Weise wie für Harn und Blut beschrieben: es wird auch in der Aschenlösung in essigsaurer Lösung mit Ammoniumoxalat gefällt und nach Zersetzung des Calciumoxalates die Oxalsäure mit Permanganat oxydimetrisch bestimmt.

Die Menge der anzuwendenden Aschenlösung schwankt in ziemlich weiten Grenzen, da der Kalkgehalt der verschiedenen Organe nicht unbeträchtliche Abweichungen zeigt. Für Muskel, der in feuchtem Zustand schätzungsweise 0,2% enthält, wird man bei Anwendung einer Asche aus 5 g frischer Substanz und einer Auffüllung auf 25 ccm ungefähr 5 ccm zur Analyse verwenden, da sonst die Mengen zu gering sind. Von Knochen, der ungefähr 12% enthält, nimmt man dementsprechend weniger. Man gibt zur Probe der Aschenlösung in einem großen Zentrifugenglas Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion zu und säuert dann mit Essigsäure an, wobei sich ein vorher gebildeter Niederschlag wieder lösen muß. Man fügt nun dazu 2 ccm einer gesättigten Lösung von Ammoniumoxalat und läßt mindestens 1 Stunde bis zur völligen Ausfällung stehen; längeres Stehen schadet nichts. Man zentrifugiert dann scharf ab und überführt die überstehende Lösung vorsichtig in ein anderes Zentrifugenglas konischer Form, um in ihr sodann die Magnesiumbestimmung auszuführen. Ist eine solche nicht gewünscht, kann die überstehende Flüssigkeit natürlich fortgegossen werden. Man wäscht den Ca-Niederschlag unter jedesmaligem Auf-

wirbeln 3mal mit reichlichen Mengen Wasser unter Zentrifugieren, wie wiederholt beschrieben, sehr gut aus und macht dann in dem von Oxalat vollständig befreiten — Prüfung des letzten Waschwassers mit Calciumchloridlösung — Rückstand die Bestimmung in üblicher Weise.

Will man in derselben Portion das Magnesium bestimmen, empfiehlt es sich, nach Abgießen der ersten Flüssigkeit, das erstemal nur mit sehr wenig Wasser zu waschen und dann die Flüssigkeit der auf Magnesium zu analysierenden zuzufügen. Sonst bekommt man für die Magnesiumbestimmung zu viel Flüssigkeit. Man muß aber dann nochmals 3mal, wie eben beschrieben, den Niederschlag von oxalsaurem Kalk mit der Zentrifuge auswaschen.

Den Rückstand von Calciumoxalat löst man in 5 ccm Normalschwefelsäure und erwärmt im Wasserbad auf 80 Grad; man titriert nun in üblicher Weise mit n/100 Permanganatlösung, bis gerade ein schwach rosa Farbenton 1 Minute lang bestehenbleibt. Der Calciumgehalt ergibt sich daraus, daß 1 ccm 1/100 Permanganat 0,2 mg Calcium entspricht. Weitere Berechnung erfolgt in üblicher Weise.

Bestimmung des Magnesiums.

Diese erfolgt wie stets (vgl. auch Harn und Blut) in der von Calcium bereits befreiten Lösung, wird also mit der des Calciums zusammen ausgeführt. Man überführt die erste, von der Calciumfällung abzentrifugierte Lösung möglichst quantitativ in ein großes, unten konisches Zentrifugenglas und dazu das erste Waschwasser. Um nicht zu große Flüssigkeitsmengen zu haben, wäscht man den Calciumniederschlag, wie schon oben beschrieben ist, das erstemal nur mit wenig Wasser aus. Zur Gesamtflüssigkeit fügt man 2 ccm einer 10%igen Lösung von Ammoniumphosphat und 2—3 ccm 25%iges Ammoniak. Die Lösung muß deutlich ammoniakalisch riechen; noch mehr Ammoniak zuzugeben, ist vom Übel. Man läßt gut bedeckt, am besten mit einem Kork verschlossen, über Nacht stehen. Ganz zweckmäßig ist es, vorher die Wände des Zentrifugenglases mit einem feinen, jedoch nicht zu scharfen Glasstab am unteren Teil etwas zu reiben, um die Ausfällung zu begünstigen. Am nächsten Tag zentrifugiert man ab,

gießt die überstehende Flüssigkeit ab und wäscht den Niederschlag ohne starkes Aufrühren zweimal mit ca. 15 ccm einer 2%igen Ammoniaklösung, hergestellt aus 20%iger Ammoniaklösung durch 10fache Verdünnung mit destilliertem Wasser. Zuletzt wäscht man mit der gleichen Menge alkoholischer Ammoniakmischung (20 Teile 25%igen Ammoniak + 80 Teile 96%iger Alkohol). Man gießt wieder ab, stellt darauf das Zentrifugenglas in ein Gefäß mit siedendem Wasser, bis der Rückstand ganz trocken geworden ist. Man gibt 1 ccm n/10 Salzsäure dazu und läßt einige Stunden stehen, bis der Niederschlag sich ganz gelöst hat. Macht die Lösung Schwierigkeiten, so wird etwas erwärmt; Zusatz von mehr Salzsäure muß vermieden werden. Man überführt die Lösung unter mehrmaligem Nachspülen mit Wasser in einen Meßkolben von 50 ccm und füllt mit destilliertem Wasser auf. Von der gut durchgemischten Lösung werden 10—20 ccm je nach dem Magnesiumgehalt zur Analyse verwendet. Ist der Magnesiumgehalt sehr gering, so kann man auch nur auf 25 ccm auffüllen und davon einen mehr oder weniger großen Teil verwenden. Zur Bestimmung des Magnesiums dient die beim Blut angegebene Methode: als Standardlösung wird die auf S. 84 angegebene Lösung von primärem Kaliumphosphat (5,605 g Kaliumphosphat zu Enzymstudien auf 1000 ccm) verwendet, die im ccm 1 mg Magnesium entspricht. Diese Lösung wird zum Versuch auf das 100fache verdünnt und in einen Meßkolben von 25 ccm 10 ccm, die einem Magnesiumgehalt von 0,1 mg entsprechen, eingefüllt. In einen anderen gleichen Kolben fügt man die gewünschte Menge der Versuchslösung, also 10 oder 20 ccm. Beide Kolben werden, wenn nötig, mit Wasser so weit ergänzt, daß sie 20 ccm Flüssigkeit enthalten. Man fügt nun in jeden Kolben in ganz gleicher Weise wie bei der Magnesiumbestimmung im Blut beschrieben, 1 ccm Molybdänlösung, darauf 1 ccm Hydrochinonlösung, mischt durch, gibt nach einigen Minuten 5 ccm Carbonatsulfitlösung (darf nicht älter als 2 Wochen sein!) zu, füllt bis zur Marke auf, mischt und schließt möglichst bald den kolorimetrischen Vergleich an. Die Menge des Magnesiums in der zuletzt angewandten Portion ergibt sich nach der üblichen Formel,

wobei $c_1 = 0{,}1$ mg Magnesium ist. Daraus berechnet sich durch entsprechende Multiplikation der Magnesiumgehalt in der Flüssigkeitsmenge, die zuerst für die Calciumbestimmung angesetzt war und daraus sinngemäß die Menge in der gesamten angewandten Substanz bzw. in Prozenten derselben.

Bestimmung des Phosphors.

Hier ergeben sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten: man kann entweder von der getrockneten Substanz ausgehen und darin entweder die Bestimmung des Gesamtphosphors oder die getrennte Bestimmung des Lipoidphosphors und des übrigen Phosphors ausführen, während man zur Bestimmung des säurelöslichen Phosphors, des anorganischen sowie des gesamten, von frischer Substanz ausgehen muß.

Will man den Gesamtphosphor bestimmen, so benutzt man die für die Bestimmung der Kationen hergestellte Aschenlösung[1]). Man überführt eine dem erwarteten Phosphorgehalt entsprechende Menge dieser in einen Meßkolben von 50 ccm, im allgemeinen 2—5 ccm (der Phosphorgehalt der Probe soll 0,06 mg Phosphor nicht übersteigen), gibt 1 Tropfen p-Nitrophenollösung dazu und neutralisiert mit n-Natronlauge bis zur gerade eintretenden schwachen Gelbfärbung. In ein anderes Kölbchen bringt man 5 ccm der S. 72 beschriebenen Phosphatlösung mit einem Gesamtgehalt von 0,03 mg Phosphor, gibt in beide Kölbchen so viel Wasser, daß die Gesamtmenge ca. 30 ccm beträgt, gibt dann genau mit der Pipette in beide Kölbchen 5 ccm verdünnte Salpetersäure (S. 72) und nach gutem Mischen 2 ccm Molybdän-Strychnin-Reagens (S. 72). Man füllt bis zur Marke auf, läßt 20 Minuten stehen, gibt je 2 ccm verdünnte Gummiarabikumlösung (S. 72) in jedes Glas, mischt durch und macht die Bestimmung im Nephelometer. Die Berechnung erfolgt in der bekannten Weise, wobei selbstverständlich noch zum Schluß auf die Gesamtmenge und deren Gewicht bezogen werden muß.

[1]) Es gibt H_2O_2-Präparate, welche P enthalten: mit solchen darf die Veraschung nicht vorgenommen werden!

Man kann die Bestimmung auch kolorimetrisch ausführen. Man geht dann ebenfalls von der Aschenlösung aus, und arbeitet in derselben Weise, wie auf S. 75 für die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtphosphors im Blute geschildert worden ist. Den Aciditätsverhältnissen ist genaueste Beachtung zu schenken.

Will man den Lipoidphosphor gesondert bestimmen, so ist es nur nötig, das trockene gepulverte Organ vorher erschöpfend mit Äther zu extrahieren und im Ätherextrakt den Phosphor nach Veraschung in gleicher Weise wie oben geschildert zu bestimmen. Um mit kleinen Mengen arbeiten zu können, sind die gewöhnlichen Extraktionsapparate zu groß. Man verwendet Mikro-Soxhlet-Apparate, deren Ansatzgefäß nur ca. 25 ccm Äther faßt. Die Abmessung des Apparates sind derartige, daß Hülsen von 1 cm Durchmesser und ca. 5 cm Länge hereinpassen, in welche man, natürlich genau gewogen, ungefähr 1 g der getrockneten Substanz, mittelfein gepulvert — wenn es zu fein gepulvert ist, backen die einzelnen Teilchen zu sehr aneinander und lassen sich nicht gut ausziehen — hereinbringt. Man stellt zweckmäßig mehrere solcher kleinen Extraktionsapparate, wie Abbildung 20 auf S. 155 zeigt, zusammen auf eine Heizplatte, hat außerdem für jeden Apparat mehrere Kölbchen, damit man bei Extraktion vieler Proben schnell hintereinander arbeiten kann. Gelegentlich wird es auch erwünscht sein, das Cholesterin zu bestimmen. Man löst dann nach erfolgter Extraktion den Ätherrückstand, den man vorher zur Feststellung der Gesamtmenge des Ätherextraktes gewogen hat, in Äther wieder auf, bringt die Lösung mit Äther auf ein bestimmtes Volumen, z. B. 10 ccm, und kann nun den einen Teil zur Phosphorbestimmung, den anderen zur Cholesterinbestimmung in der S. 127 beschriebenen Art benutzen. Die Phosphorbestimmung im Extraktionsrückstand in der Hülse ergibt den Gesamtphosphor abzüglich Lipoidphosphor.

Zur Bestimmung des anorganischen (säurelöslichen) Phosphors (Reagentien s. S. 75) wiegt man ungefähr 3 g des feuchten Organs ab, bringt es in eine Reibschale und gefriert es mit flüssiger Luft. Man zerkleinert es in diesem

Zustande unter Zusatz von Quarzsand so fein wie möglich — es geht auch, das Zerreiben ohne vorheriges Gefrieren auszuführen — und bringt dann die zerkleinerte Masse unter wiederholtem Nachwaschen mit Wasser in ein großes Zentrifugenglas, das eine Marke bei 40 hat. Man gibt dann 10 ccm 20%ige Trichloressigsäure zu, mischt gut durch, füllt bis zur Marke mit Wasser auf, mischt wiederum und zentrifugiert scharf ab. Ein aliquoter Teil der abgegossenen klaren Lösung dient in der S. 76 beschriebenen Weise zur Bestimmung des anorganischen Phosphors. In den meisten Fällen wird man 5 ccm der Lösung benutzen und mit einem Standard mit einem Gehalt von 0,1 mg P vergleichen. Der Standardlösung muß natürlich die gleiche Menge Trichloressigsäurelösung zugefügt werden, wie sie in der entsprechenden Menge der Probe enthalten ist: wurden von dieser 5 ccm benutzt, so gibt man der Vergleichslösung, unter Berücksichtigung der geringen Adsorption der Trichloressigsäure an das Koagulat, 1,2 ccm 20%ige Trichloressigsäure-Lösung zu.

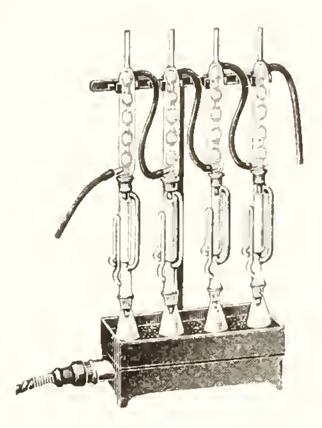


Abb. 20.

Um den gesamten säurelöslichen Phosphor zu bestimmen, geht man von der durch Zentrifugieren gewonnenen Lösung aus. In ein großes Jenaer oder Pyrex-Reagensglas pipettiert man 2 ccm Lösung, gibt 5 Tropfen konzentrierte H_2SO_4 hinzu, und erhitzt nach Zufügung einer soliden Glasperle das Röhrchen unter dem Abzug auf einem Kjeldahl-Gestell oder dgl. bis der Rückstand sich bräunt. Man löscht die Flamme und gibt unmittelbar 2 Tropfen konzentriertes Wasserstoffsuperoxyd[1]) (Perhydrol, Superoxol) dazu und erhitzt nochmals kurze Zeit, wobei der Rückstand ganz hell werden muß, ohne daß jedoch die Schwefelsäure entweicht. Ist dies nicht der Fall gewesen, so wird 1 Tropfen H_2O_2 zugegeben und das Er-

[1]) P-frei.

hitzen wiederholt. Nach Zufügen von einigen ccm Wasser wird zum Zersetzen etwa noch vorhandenen H_2O_2 aufgekocht und die gesamte Lösung zur Analyse genommen. Der Standardlösung sind ebenfalls 5 Tropfen konzentrierte H_2SO_4 zuzufügen, im übrigen erfolgt die Bestimmung wie beschrieben.

Bestimmung des Chlors (gesamte Halogene).

Für die Bestimmung des Chlors (in Wirklichkeit der gesamten Halogene) ist eine besondere Veraschung notwendig. Man verfährt grundsätzlich in der gleichen Weise, wie es für die Bestimmung der Halogene im Blut beschrieben worden ist, indem man die Veraschung erst nach Zusatz von Silbernitrat vornimmt. Das ist aus dem Grunde notwendig, weil andernfalls das Chlor bei der Veraschung sich verflüchtigt.

In einen Mikrokjeldahlkolben bringt man eine genau abgemessene Menge der feuchten oder auch auf dem Wasserbad schonend getrockneten Untersuchungssubstanz. Man wählt deren Menge zweckmäßig so, daß diese nicht mehr als 3 mg Chlor enthält. Man fügt zu der Substanz 2 ccm konzentrierte Salpetersäure und — vorausgesetzt, daß die Chlormenge nicht höher ist als eben angegeben — 5 ccm n/50 Silbernitratlösung. Man gibt des ferneren ungefähr 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd dazu und führt die Veraschung in der früher geschilderten Weise aus, indem man bis zum völligen Verschwinden der organischen Substanz unter öfterem Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd und gelegentlichem von Salpetersäure die Veraschung zu Ende führt. Es ist selbstverständlich, daß hier die bei der gewöhnlichen Veraschung angegebene Vertreibung der Salpetersäure unter Salzsäurezusatz unterbleiben muß. Man überführt die im Kölbchen zurückgebliebene Lösung unter Zusatz von ungefähr 1 ccm verdünnter Salpetersäure und Nachspülen mit möglichst wenig Wasser in ein kleines Kölbchen oder in eine kleine glasierte Porzellanschale. Man gibt eine Messerspitze Eisenammoniakalaun zu und titriert in der bereits früher angegebenen Weise mit n/50 Rhodanammoniumlösung, bis eben eine Rotfärbung auftritt. Aus der Differenz der zugegebenen

ccm Silbernitratlösung minus der bis zur Rotfärbung verbrauchten ccm Rhodanammoniumlösung ermittelt sich der Chlorgehalt in der angewandten Substanzmenge in mg durch Multiplikation mit 0,71.

Der auf diese Weise erhaltene Wert ergibt die Gesamtheit der vorhandenen Halogene als Chlor. In vielen Fällen wird das ohne weiteres als richtig zu unterstellen sein, man muß jedoch daran denken, daß auch Brom und Jod in der gleichen Weise reagieren und diese Halogene in der Berechnung ebenfalls als Chlor erscheinen. Sollten also durch qualitative Proben andere Halogene in größerer Menge nachgewiesen sein, so wird man das erhaltene Resultat so ausdrücken müssen, daß es die gesamten Halogene, als Chlor ausgedrückt, wiedergibt, und zwar entsprechen 35,5 mg Chlor 79 mg Brom bzw. 126 mg Jod.

Aus der schon oben erwähnten Tatsache, daß Chlor, welches nicht an Silber gebunden ist, bei der Veraschung fortgeht, ergibt sich, daß, wenn schon der erste Tropfen Rhodanammonium bei der Titration eine Rotfärbung erzeugt, die zugegebene Silbermenge nicht groß genug war, um sämtliches Halogen zu binden, die Analyse also nicht verwertbar ist. Sie muß dann mit weniger Substanz, bzw. unter Zusatz einer größeren Menge Silbernitratlösung vor der Veraschung wiederholt werden.

Bestimmung des Gesamtschwefels.

Diese erfolgt grundsätzlich nach dem S. 21 für Harn angegebenen Verfahren. Sie muß ebenfalls in einer gesonderten Probe durchgeführt werden. Man trocknet das Organ auf dem Wasserbad, zerkleinert gut und nimmt entweder die ganze Menge oder bei größeren Substanzmengen einen aliquoten, mit der chemischen Wage genau abgewogenen Teil zur Analyse. Zweckmäßig verwendet man bei gewöhnlichen Trockenorganen 0,5—0,8 g, bei Fäces etwas mehr, von Hornsubstanz ungefähr dieselbe Menge wie von trockenem Organ. Man wiegt die zur Analyse bestimmte Menge direkt in das Porzellan-Zentrifugenrohr ein, gibt dazu 1—2 g pulverisierten Salpeter (Kaliumnitrat) und 1—2 ccm konzentrierte Salpetersäure.

Nachdem die erste Reaktion abgeklungen ist, dampft man auf kleiner, freier Flamme die Hauptmenge der Salpetersäure ab und gibt dann zu der noch nicht ganz trockenen, erkalteten Mischung 10 ccm der Benedictschen Lösung (S. 24). Man dampft bei kleiner Flamme die Flüssigkeit ab und erhitzt dann stärker bis zur Rotglut. Nachdem man das Rohr einige Zeit auf dieser Temperatur gelassen hat — im allgemeinen genügen 10—15 Minuten —, erhält man eine in der Hitze flüssige Schmelze, die man nun erkalten läßt. Man löst, wenn nötig unter leichtem Erwärmen, den Rückstand in 10 ccm Salzsäure 1 : 4 (S. 24), vertreibt durch Aufkochen die eventuell noch vorhandene Salpetersäure und fällt in der Hitze durch Zusatz von 10%iger Bariumchloridlösung, die man vorher ebenfalls auf dieselbe Temperatur erwärmt hat. Man mischt mit einem Glasstab gut durch und verfährt nun weiter in der gleichen Weise, wie es bei der Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn beschrieben worden ist. Man zentrifugiert den Niederschlag ab, entfernt möglichst vollständig die überstehende Lösung, gibt warmes Wasser in der gleichen Weise unter Aufrühren des Niederschlages hinzu, zentrifugiert nochmals, gibt wieder nach Abgießen der klaren Flüssigkeit warmes destilliertes Wasser zu, rührt wieder auf, zentrifugiert, gießt wieder ab und wiederholt dies so oft, bis die klare Flüssigkeit chlorfrei ist, d. h. mit Silbernitrat keine Fällung mehr gibt. Nachdem das letzte Waschwasser abgegossen ist, dampft man den Rest der Flüssigkeit auf dem Wasserbade ab, glüht dann das Zentrifugenröhrchen auf langsam heißer werdender Flamme, überführt das noch heiße Röhrchen in einen Exsikkator, läßt dort erkalten und wiegt. Die Menge des gebildeten Bariumsulfats, ermittelt aus dem Gewicht des Zentrifugenröhrchens leer und nach Beendigung des Versuches, multipliziert mit 0,1373 ergibt die Menge des Gesamtschwefels in der für die Analyse angewandten Substanzmenge. Die Umrechnung auf die gesamte Trockensubstanz bei Anwendung eines aliquoten Teils, ferner die Umrechnung auf Schwefelgehalt in der feuchten Organmasse erfolgt nach den gewöhnlichen Regeln.

Bestimmung der Gesamtsulfate.

Ungefähr 5 g des frischen Organs werden in einer Schale (durch Schere oder Messer) zerkleinert, darauf durch Einstellen der Schale in eine Kältemischung oder durch flüssige Luft oder Kohlensäure gefroren und mit einem Mörser fein zerrieben. Man überführt in einen 50-ccm-Meßkolben, spült mit Wasser nach, bis das Volumen ungefähr 35 ccm beträgt, gibt 10 ccm einer 20%igen Trichloressigsäurelösung zu, mischt, füllt zur Marke auf und filtriert oder zentrifugiert. Von dem meist gefärbten Filtrat werden 10 ccm mit einigen Tropfen konzentrierter Permanganatlösung und einigen Tropfen Perhydrol zwecks Entfärbung versetzt und aufgekocht. Es werden dann, wie S. 27 für Harn beschrieben, 1 ccm n/10 HCl zugesetzt und erhitzt, bis noch ungefähr 1 ccm Rückstand bleibt. Dieser wird in 15 ccm n/10 HCl gelöst, anderseits eine Kontrollösung hergestellt aus 1 ccm Standardlösung mit 0,1 mg S mit 15 ccm n/10 HCl und beide Lösungen mit NaOH, Gelatine und Bariumchlorid versetzt. Nach 15 Minuten wird im Nephelometer verglichen und die Berechnung in üblicher Weise durchgeführt.

Bestimmung des Eisens.

Man verfährt in gleicher Weise, wie für Blut (S. 86) angegeben. Man kann die Analyse in der allgemeinen Aschenlösung vornehmen und in einem aliquoten Teil derselben die Bestimmung durchführen. Sonst wiegt man eine entsprechende Menge im Wägegläschen ab, gibt dazu eine gemessene Menge von konzentrierter Schwefelsäure und läßt über Nacht stehen. Dann überführt man quantitativ unter Nachspülen mit Wasser in einen Mikrokjeldahlkolben, verascht wie S. 87 angegeben unter Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd und macht in einem aliquoten Teil der aufgefüllten Lösung die kolorimetrische Analyse, wobei darauf zu achten ist, daß zur Vergleichslösung 1/5 der Schwefelsäuremenge zugefügt werden, die in der zum kolorimetrischen Vergleich verwandten Versuchs-Lösung enthalten waren, da der Säuregehalt für die Ausbildung der Rhodan-Eisen-Färbung von großer Bedeutung ist.

Eisen ist ein sehr verbreitetes Element, das sich auch vielfach als Verunreinigung von Reagentien findet. Diese sind daher sorgfältig zu prüfen.

Blutuntersuchung durch Gasanalyse.

a) Bestimmungen mit der Barcroftschen Methodik.

Die hier zunächst zu beschreibenden gasanalytischen Messungen beruhen auf der Messung des freigesetzten Gases mit Hilfe eines Manometers, welches das Gefäß mit der zu analysierenden Lösung und ein gleich großes Kontrollgefäß mit gleichem Flüssigkeitsinhalt verbindet. Sie werden im großen oder kleinen Barcroftschen Apparat vorgenommen. Der größere (s. Abb. 21) besteht aus zwei Flaschen von Eiform gleicher Größe, die ungefähr 25 ccm enthalten und auf 0,1 ccm übereinstimmen müssen. Diese dienen zur Aufnahme der zu analysierenden Substanz. Verbunden werden diese Flaschen durch ein Manometer (h, f), das aus einer Kapillare von ca. 1 mm Durchmesser besteht, deren beide Enden durch Dreiweghähne (i, e) entweder mit der Außenluft oder den Flaschen kommunizieren. Die Verbindung dieser mit dem Manometer erfolgt durch ein Kopfstück, das folgendermaßen konstruiert ist (s. Abb. 22 nach Straub).

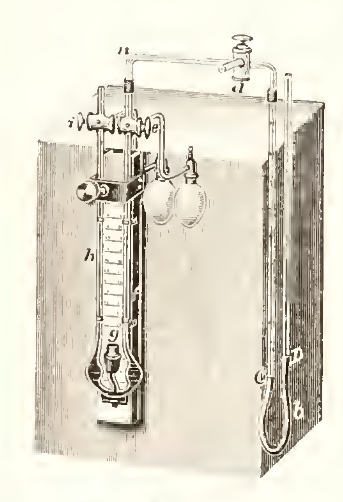
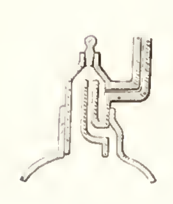


Abb. 21.

In die Kuppel, auf welche die Flasche von unten her luftdicht aufgesteckt werden kann, ist ein kleines Glasrohr eingeschmolzen, das ca. 0,3 ccm Flüssigkeit faßt. Das untere Rohrende mündet durch ein Loch frei auf die Außenseite der Kuppel. Wird die Flasche aufgesteckt,


Abb. 22.

so ist bei gewöhnlicher Stellung dieses Loch durch den Flaschenhals verschlossen. An einer Stelle jedoch hat der Flaschenhals eine Ausbuchtung; dreht man die Flasche so, daß die Öffnung des Rohres auf diesen Teil fällt, so kann Flüssigkeit, welche in dem Rohr enthalten war, ausfließen und sich mit der in der Flasche bereits vorhandenen mischen. Oben hat die Kuppel eine mit einem Glasstopfen gasdicht verschließbare Öffnung, durch welche man das Rohr von oben her mit Hilfe einer feinen Pipette füllen kann.

Das Manometer liegt auf einer Skala aus Spiegelglas, so daß bei der Ablesung parallaktische Fehler vermieden werden. Das Manometerrohr, das ganz rein und trocken sein muß, wird mit Nelkenöl gefüllt, und zwar verwendet man zum Füllen das untere Mittelstück g, in welches man, nach Herstellung der Kommunikation der Manometerenden mit der Außenluft, die Sperrflüssigkeit einfüllt. Man gibt so viel Öl herein, daß nach Verschluß des Stopfens bei g (Gummistopfen, noch mit Paraffin zu dichten) das Niveau ungefähr in halber Höhe der Skala steht. Neuere Apparate haben hier ein Steigrohr, das ungefähr in halber Höhe mit einem Hahn verschlossen wird. Über diesem befindet sich eine trichterähnliche Ausbuchtung, durch welche das Einfüllen des Öls erfolgt.

Für noch kleinere Mengen dient ein Apparat, bestehend aus einem Manometer von 0,5 mm Durchmesser, das ebenfalls auf einer Spiegelglasskala montiert ist. Am oberen Ende beider Schenkel sind ebenfalls Dreiwegehähne angebracht, so daß das Manometer einmal mit der freien Luft, das andere Mal mit einem Ansatzstück korrespondiert, an das eine kleine Flasche (Abb. 23a) durch einen Schliff aufgesetzt werden kann. In ihre untere Höhlung y wird das zu bestimmende Material eingefüllt, in die obere der Zusatz; durch einfaches Umdrehen der Flasche am Ansatzstück (Abb. 23b) wird die obere Flüssigkeit in die untere hereingegossen, so daß die Reaktion vor sich geht.

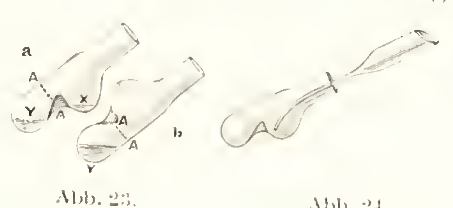


Abb. 23. Abb. 24.

Die beiden Flaschen müssen ganz gleich sein, was sich ja aus der in

Anwendung kommenden Differenzmethodik als unumgänglich ergibt. Zum Füllen der oberen Höhlung benutzt man zweckmäßig etwas rund gebogene Pipetten (Abb. 21).

Die Füllung auch dieses Apparates erfolgt mit Nelkenöl oder mit einer Mischung aus 80 Teilen Amylalkohol und 20 Teilen reinstem Olivenöl. Man gibt mit einer Kapillarpipette, die man bis zu der Verengerung des Rohres in das Manometerrohr der einen Seite (x in Abb. 25) einführt, etwas Öl herein, während der Hahn des anderen Manometerrohrs geschlossen ist. Nach Herausziehen der Pipette öffnet man diesen Hahn vorsichtig so weit, daß das Öl in das Kapillarrohr eintreten kann und gerade noch die untere Biegung füllt. Man schließt den Hahn wieder und entfernt nun mit Hilfe von Fließpapier den Überschuß von Öl, der sich noch in den weiteren Teilen befinden sollte, sehr sorgfältig; man öffnet dann den Hahn der anderen Seite wiederum, worauf sich das Öl in den beiden Schenkeln horizontal einstellt und die Menisken ungefähr in der Mitte der Skala liegen.



Abb. 25.

Wenn man auch für die Barcroftschen Apparate eine Konstante für jede Art der Bestimmung eruieren kann, indem man z. B. die Menge Sauerstoff mißt, die aus einer gewissen Menge Wasserstoffsuperoxyd entsteht, oder den bei der Zersetzung einer bestimmten Menge Harnstoff entstehenden Stickstoff, so empfiehlt es sich doch eher, für die benutzten Apparate eine Konstante festzustellen, die man für alle Zwecke gebrauchen kann, vorausgesetzt, daß die Flüssigkeitsmenge in den Flaschen die gleiche bleibt. Diese Konstante muß aussagen, wieviel Millimeter Ausschlag einer bekannten Gasmenge entsprechen. Am besten eignet sich hiefür die Methode von Münzer und Neumann. Diese Bestimmung erfolgt folgendermaßen (s. Abb. 21): An den einen Schenkel des Manometerrohrs, für dessen Flasche man die Konstante bestimmen will, wird durch ein zweimal rechtwinklig gebogenes Kapillarstück, das durch einen Hahn d mit der Außenluft kommunizieren kann, und durch zwischengeschalteten Druckschlauch eine Meßpipette C, in $^1/_{100}$ ccm geteilt und genau kalibriert (wenn man nicht eine solche Pipette erhalten

kann, muß man sich eine vorhandene selbst eichen, damit man genau weiß, welchem Volumen ein Teilstrich entspricht) angesetzt, deren anderes Ende durch einen Druckschlauch b mit dem Niveaurohr D verbunden ist. Meßpipette und Niveaurohr dürfen nicht kapillar sein und genau gleiche innere Weite haben. In C und D und das verbindende Schlauchstück wird Wasser eingefüllt, so daß die Pipetten ungefähr bis zur halben Höhe gefüllt sind. Die Flaschen wurden vorher mit der Menge Wasser gefüllt, die der später beim Versuch gebrauchten Flüssigkeitsmenge entspricht. Die Hähne i, e, d werden geöffnet, D wird so weit gesenkt — die ganze Apparatur befindet sich dauernd im Wasserbad —, daß der Meniskus im unteren Teile von C steht. Nachdem sich im ganzen Apparat Atmosphärendruck eingestellt hat, wird durch Schließen der Hähne i und d die Verbindung dieser mit der Außenluft aufgehoben; während der Manometerschenkel f andauernd durch Hahn e mit dem Kapillarstück n kommuniziert, der Meniskusstand in den beiden Schenkeln h und f und der Eichpipette C notiert; darauf wird das Niveaurohr D gehoben, bis im Manometer die gewünschte Niveaudifferenz auftritt, Hahn e wird geschlossen und D so weit gesenkt, daß der Wasserstand in ihm und C gleich hoch ist. Die Differenz der beiden Pipettenablesungen vor und nach dem Versuche gibt das Volumen des eingepreßten Gases unter den herrschenden Temperatur- und Druckverhältnissen. Diese Zahl, dividiert durch den Niveauunterschied im Manometer, liefert die Konstante.

Beispiel: Birnenvolumen abzüglich der Füllung (Raum der Birne + Kapillarschaltung bis zum Nelkenöl) 24,33 ccm.

Eingepreßtes Luftvolumen cmm	Höhendifferenz im Manometer mm	Konstante
106	29,8	3,56
138	38,9	3,55
174	48,6	3,58
264	74,8	3,53
294	82,2	3,58
267	75,9	3,52

Mittelwert von k = 3,55.

Bei Berechnungen ist folgendes zu beachten:

Die Konstante ist unabhängig von der Temperatur, abhängig dagegen — außer von dem Flüssigkeitsinhalt der Flaschen — vom Luftdruck. Für genaue Messungen ist es zweckmäßig, k für verschiedene Drucke zu bestimmen und die Werte graphisch aufzuzeichnen. Man erhält eine gerade Linie, aus der man den gesuchten Wert ohne Schwierigkeit entnehmen kann.

Für jedes Füllungsverhältnis muß die Konstante natürlich neu bestimmt werden. Es ist zweckmäßig, die Konstante für verschiedene Füllungen zu bestimmen und die Resultate graphisch aufzutragen. Man erhält dann ebenfalls eine gerade Linie, aus der man die gesuchten Werte für k bei verschiedenem Flüssigkeitsgehalt entnehmen kann.

Die Bestimmung für k ist in der gleichen Weise für die zweite Flasche zu wiederholen. Sind die Konstanten für die beiden Flaschen gleich oder fast gleich, was bei gut gearbeiteten Apparaten die Regel ist, nimmt man das Mittel für beide Flaschen, sonst muß für jede Flasche ihre Konstante eingesetzt werden.

Von manchen Fabrikanten (z. B. Bleckmann & Burger, Berlin) werden den Apparaten die für die Eichung notwendigen Daten beigegeben, und zwar 1. der Inhalt der Flasche einschließlich Kapillare bis zum Hahn und 2. eine Konstante b. Die Konstante der Flasche berechnet sich dann aus der Formel

$$\text{Konstante} = \frac{v}{p} + b,$$

wobei v den Inhalt der Flasche in ccm (angegebener Inhalt — Füllung), p den Druck des Nelkenöls = 10 000 gesetzt (für Petroleum ist 12 900 einzusetzen), b eine gewisse, für jede Flasche charakteristische Zahl, z. B. 0,882 ist. War der Inhalt der leeren Flasche 28 000 cmm, die Füllung 3200 cmm, so würde sich die Konstante für diese Füllung bei dem angenommenen Wert für b und Füllung mit Nelkenöl berechnen zu

$$\frac{28\,000 - 3200}{10\,000} + 0{,}882 = 2{,}48 + 0{,}882 = 3{,}362.$$

Durch diese Angaben wird die Berechnung erheblich vereinfacht.

Die Eichung des kleinen Barcroftschen Apparates erfolgt in genau der gleichen Weise.

Bei den später zu schildernden Versuchen gibt das Produkt Niveaudifferenz · Konstante bei dem geeichten Apparat das Volumen des in der mit einer bestimmten Menge Flüssigkeit beschickten Birne entwickelten Gases unter den herrschenden Luftdruck- und Temperaturverhältnissen an. Die Reduktion dieses Wertes auf 0 Grad und 760 mm erfolgt nach der bekannten Formel $v_0 = \frac{v\,p}{760\,(1 + \alpha\,t)}$; hiebei bedeutet v das bereits mit Hilfe der Konstanten festgestellte Volumen, p den Luftdruck, t die Temperatur und α den Ausdehnungskoeffizienten der Gase $= \frac{1}{273}$.

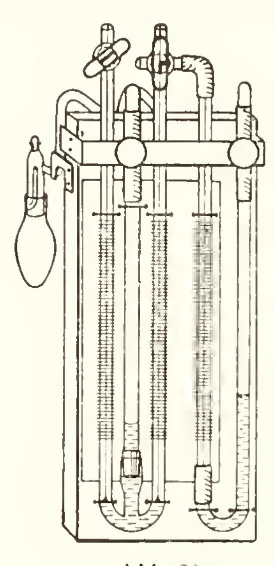
Die gasanalytischen Messungen erfordern eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen. Alle Hähne sowie die Glasschliffe zum Ansatz der Flaschen sowie sonstige Schliffe müssen gut gefettet werden, damit kein Gas auf falschem Wege entweichen kann. Es soll für diesen Zweck gutes Mineralfett (sog. Hahn-Fett) verwendet werden; es ist nur in dünner Schicht aufzutragen: zu starkes Fetten erzielt oft die der gewünschten entgegengesetzte Wirkung. Richtig gefettete Schliffe erscheinen durchweg dunkel: helle Flecken zeigen Stellen an, die nicht dicht aufeinanderliegen. Flaschen usw. müssen vor der Beschickung mit den Lösungen ganz trocken sein. Die Füllung beider Flaschen muß stets gleich sein, da bei verschiedenem Volumen sich die Konstante ändert. Zum Abmessen müssen genau kalibrierte Pipetten verwendet werden, sie müssen in jedem Ausmaß bis zum kleinsten (0,1 ccm geteilt in 0,001 ccm) vorhanden sein.

b) Modifikation der Gasanalyse nach Barcroft von Verzár.

Um die Bestimmung der „Konstanten" bei den Barcroftschen Apparaten, welche immerhin einige Schwierigkeiten

machen kann, zu vermeiden, hat Verzár folgende Modifikation angegeben (Abb. 25).

Die eine Seite des Barcroftschen Manometers ist mit Hilfe eines gebohrten Vierwegehahnes und einer Gummiverbindung mit einer Pipette verbunden, welche 0,3 ccm (300 cmm), sehr genau in 0,001 cmm graduiert (erst zu eichen!), faßt. Diese Pipette erhält an ihrem unteren Teil eine Fortsetzung in Form eines zweiten, mit ihr U-förmig verbundenen Schenkels. Dieses U-förmige Rohr wird ebenso wie das Manometer des Barcroft-Apparates mit Öl gefüllt. Der nicht mit dem Manometer verbundene Schenkel des U-förmigen Rohres trägt oben eine Gummikappe, welche durch eine Schraube mehr oder weniger zusammengequetscht werden kann. Verzár verbindet diese Schraube mit Hilfe eines wagrechten Stückes mit der zweiten Schraube bei den älteren Modellen der Barcroft Apparate, welche in Verbindung mit dem Einfüllschenkel des Manometers steht und das Niveau in diesem zu verstellen gestattet. Durch die am äußeren Schenkel des U-Rohrs vorhandene Schraube kann man in der 0,3-ccm-Pipette das Ölniveau beliebig verstellen. Das Prinzip des Arbeitens mit dem Apparat ist das folgende: Man läßt in üblicher Weise im Barcroft-Manometer eine Niveaudifferenz entstehen und gleicht dieselbe durch Veränderung des Öl-Niveaus in der 0,3-ccm-Pipette aus. Die Differenz zwischen dem Stand des Öles in der Pipette vor und nach dem Versuche gibt direkt die entwickelten bzw. absorbierten Kubikmillimeter Gas.


Abb. 26.

Man arbeitet mit dem Apparat auf folgende Weise. Der rechte Hahn (also der Vierwegehahn) steht zunächst └─; in dieser Lage wird das Pipettenniveau bei Luftdruck eingestellt. Dann wird er ─┐ gedreht und nun das Differentialmanometer, welches auch durch den anderen Hahn mit der Außenluft kommuniziert, bei Luftdruck eingestellt.

Die Füllung der eiförmigen Ansatzflaschen, die genau gleichen Inhalt haben müssen, erfolgt mit gleichen Mengen Flüssigkeit, und zwar kommt die Versuchslösung stets in die der Meßpipette benachbarte Flasche. Ist nach 5 Minuten Verweilens im Wasserbad Temperaturausgleich erfolgt, was durchaus nach den früher erörterten Prinzipien geschieht, wird der linke Hahn des Barcroft-Apparates zugedreht und der rechte /\ gestellt, so daß er in keiner Richtung, weder nach dem Manometer noch nach der Pipette hin, geöffnet ist. Jetzt werden die Stellungen des Öles in den beiden Manometerrohren und in der Pipette abgelesen und notiert. Darauf wird in üblicher Weise durch Schütteln bzw. Zufließenlassen der betreffenden Flüssigkeit die Analyse ausgeführt, wobei im Differentialmanometer natürlich eine Druckdifferenz entsteht. Man stellt den Vierwegehahn nun |‾, daß Differentialmanometer und Pipette miteinander verbunden sind, und dreht jetzt die Schraube, welche das mit der Meßpipette kommunizierende U-Rohr abschließt, so lange, bis in den Schenkeln des Differentialmanometers der gleiche Stand erreicht ist, wie er vor der Anstellung der Analyse bestand, also im allgemeinen gleich hoher Stand in den beiden Schenkeln. Es wird nunmehr der Stand des Öles an der Meßpipette abgelesen: die Differenz zwischen Ablesung vor Anstellung des Versuches und nach Versuch gibt direkt das entwickelte Gasvolumen an.

Die anfängliche Einstellung des Ölniveaus in der Meßpipette richtet sich danach, ob man eine Gasbildung oder eine Gasabsorption erwartet. Im ersteren Falle ist das Ölniveau mit Hilfe der rechten Schraube auf den oberen Teil der Skala einzustellen, bei erwartetem Gasverbrauch dagegen auf den unteren Teil der Skala der Meßpipette.

Man kann mit dem Apparat auch, wenn nötig, Gasvolumina bestimmen, welche größer sind, als der Pipettenskala entspricht. Das ist z. B. möglich bei CO_2-Bestimmungen, wenn eine größere Blutmenge genommen wurde, als 300 cmm CO_2 entspricht. In solchem Falle, der jedoch besser vermieden wird und in dem es grundsätzlich zweckmäßig ist, die Bestimmung mit einer geringeren Blutmenge nochmals zu wiederholen, kann man sich so helfen, daß man, nachdem zuerst so viel Luft ausgetrieben wurde, daß das Öl in der Pipette bis zum unteren Skalenrand reicht, dann

den Hahn └─ stellt, das Öl in der Pipette wieder bis zum oberen Skalenrand hebt, den Hahn wieder ┌─ stellt, noch einmal Gas übertreibt, bzw. das so oft wiederholt, bis das Differentialmanometer keine Druckdifferenz mehr zeigt.

Eine Apparatur, welche die Schlauchverbindung vermeidet, ist in dem Migos-Apparat[1]) gegeben (Abb. 27). Die Arbeit mit diesem Apparat ist grundsätzlich die gleiche. Durch Schliffe sind folgende 3 Stellungen möglich: 1. Verbindung des Manometerschenkels sowie der Meßpipette mit der freien Atmosphäre — (Stellung bei Einstellung der Manometer). — 2. Verbindung des Manometerschenkels mit der mit der Blutlösung beschickten Birne — (Gasentwicklung). — 3. Verbindung von Manometerschenkel und der geeichten Meßpipette — Einstellung der Flüssigkeit in der Meßpipette, bis das ursprüngliche Niveau in den Manometerschenkeln wieder erreicht ist. Man beachte, daß die Reaktion in der der Meßpipette benachbarten Flasche erfolgen muß.

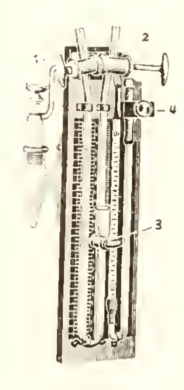


Abb. 27.

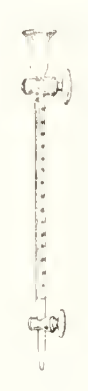
Wie Verzár besonders hervorhebt, ist für die Untersuchung von Blut durch Gasanalyse einerseits eine Verhinderung der Gerinnung erforderlich, anderseits muß das Blut mit dem Gasgehalt aufbewahrt werden, mit dem es entnommen worden ist. Für die Entnahme des Kapillarblutes zur CO_2-Bestimmung — die Methode läßt sich sinngemäß auch für anderes Blut verwenden — wird (nach Verzár modifiziert) folgendermaßen verfahren.

Abbildung 28 zeigt eine Trichterpipette, deren Trichter ca. 8 ccm, deren zwischen den beiden Hähnen gelegener Raum 1 ccm enthält, welche in Teile von 0,05 ccm eingeteilt sind; man kann noch 0,01 ccm schätzen. Zur Entnahme von Kapillarblut zur CO_2-Bestimmung wird die Pipette bis etwas über den oberen Hahn mit Quecksilber gefüllt. Man bringt dann in den Trichter genau 2 ccm (mit der Pipette abmessen) Saponin-Citratlösung folgender Zusammensetzung:

[1]) Hersteller Artur Goldberg, Prag.

Ammoniak 25%ig	2,0 ccm
Natriumcitrat	5,0 g
Saponin	0,5 g
Aqua destillata ad	100 ccm.

Darüber schichtet man 2—3 ccm einer blutwarmen Mischung von Paraffin und Petroläther. Der Finger wird mit Äther abgewaschen, mit der Frankeschen Nadel ein Einstich gemacht und die Fingerkuppe sofort in die Petrolätherlösung getaucht. Der Arm soll dabei herabhängen. Man läßt im allgemeinen 0,3—0,6 ccm Blut zufließen. Dasselbe passiert leicht die Paraffin-Petrolätherschicht und wird von der Saponin-Citratlösung aufgenommen. Durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstäbchen kann man die Mischung des Blutes mit der Lösung beschleunigen. Man öffnet nun zuerst den oberen Hahn, dann vorsichtig den unteren und läßt das Quecksilber solange abfließen, bis die ganze wäßrige Lösung in die Skala zwischen Quecksilber- und Paraffinölmeniskus fällt. Man liest nun die Flüssigkeitsmenge zwischen den beiden Menisken ab. Der Wert, abzüglich 2 ccm der angewandten Citratlösung entspricht der aus dem Finger gewonnenen Blutmenge. Man läßt dann vorsichtig das Quecksilber abfließen, bis die Blutlösung am Ende der Pipette erscheint. Man nimmt nun eine Birne des Gasanalyseapparates, gibt in diese eine mit der Pipette gemessene Menge Saponinlösung (1 oder 2 ccm) und schichtet unter sie die Blutlösung, indem man diese aus der Pipette solange zufließen läßt, bis das Paraffin am Auslauf erscheint. Da man die Menge der Blutlösung vorher abgelesen hat, weiß man nun genau, wieviel Flüssigkeit in der Birne enthalten ist, und muß nun in die andere Birne genau die gleiche Menge von Saponinlösung hereintun. Die Analyse selbst wird nunmehr in der unten beschriebenen Weise durchgeführt.


Abb. 28.

Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Blute.

Prinzip: Ferricyankalium setzt in schwach alkalischer Lösung aus lackfarben gemachtem Blut den gesamten Sauerstoff in Freiheit.

a) Bestimmung des Sauerstoffgehaltes in mit Sauerstoff gesättigtem Blut.

Notwendige Reagentien: 1. Ferricyankaliumlösung, kalt gesättigt — es wird so viel gepulvertes Ferricyankalium mit Wasser versetzt und gut durchgemischt, daß noch ein Rückstand bleibt —, frisch hergestellt, 2. Ammoniaklösung (4 ccm konzentrierte Ammoniaklösung werden mit destilliertem Wasser auf 1 l verdünnt).

a) Mit dem größeren Apparat (Konstante für 3,2 ccm muß vorher bestimmt sein): Man gibt in jede eiförmige Flasche 2 ccm Ammoniaklösung und mit einer Pipette, die man bis auf den Boden führt, 1 ccm defibriniertes, frisches, gründlich mit Luft durchgeschütteltes und kurz vor der Anwendung aufgeschütteltes Blut unter die Ammoniaklösung. Man schüttelt beide Flaschen gut um, bis das Blut ganz hämolysiert ist. Zugabe eines Körnchens Saponin befördert die Hämolyse. In das eine eiförmige Gefäß werden 0,2 ccm destilliertes Wasser zugefügt und die beiden gut eingefetteten Flaschen angesetzt. In die Kuppel des anderen Gefäßes — bei Benutzung des Verzárschen Migos-Apparates des nächst der Meßpipette befindlichen — bringt man 0,2 ccm Ferricyankaliumlösung, wobei die Flasche so angesetzt sein muß, daß die Lösung nicht zum Blut fließen kann, daß aber durch eine kleine Drehung der Ausfluß freigegeben wird. Man hängt den Apparat in das Wasserbad und öffnet und schließt die Hähne so oft, bis der Stand der Menisken sich nicht mehr ändert. Man notiert den Stand, stellt die Hähne so, daß das Manometer mit den Flaschen kommuniziert, und bringt durch eine Drehung der betreffenden Flasche die Ferricyankaliumlösung zum Blut. Man schüttelt den ganzen Apparat, nachdem man ihn aus dem Wasser herausgenommen hat, mit der Hand gründlich durch, hängt ihn dann wieder ins Wasserbad, läßt dessen Temperatur annehmen, liest die Menisken ab, nimmt wieder heraus, schüttelt wieder, hängt wieder in das Wasserbad, liest wieder ab und wiederholt dies, bis die Einstellung die gleiche bleibt. Die Differenz der Menisken abzüglich der eventuell vor dem Schütteln vorhandenen Differenz multipliziert mit der Konstante, die aber für die gleiche Füllung

(hier 3,2 ccm) berechnet sein muß, ergibt den gesuchten Wert, der nun noch für 0° und 760 mm korrigiert werden muß. Bei Verwendung des Verzár- bzw. Migos-Apparates stellt man nach Verbindung zur Meßpipette den ursprünglichen Stand in den Manometerschenkeln her (S. 167, 168) und liest an der Pipette direkt die Gasmenge ab.

b) Mit dem kleinen Apparat: In den unteren Teil y der beiden Flaschen wird 0,2 ccm Ammoniaklösung eingefüllt, darunter je 0,1 ccm des vorbereiteten Blutes geschichtet. Man mischt gut um, bis das Blut ganz lackfarben ist, gibt dann in die obere Mulde x der einen Flasche mit der gebogenen Pipette 0,05 ccm Ferricyankaliumlösung, in die andere 0,05 ccm Wasser, setzt beide Flaschen an, hängt in das Wasserbad und stellt den Meniskenstand fest, nachdem der Apparat die Wassertemperatur angenommen hat (s. oben). Man dreht dann das Gefäß mit der Ferricyankaliumlösung so, daß die Mulde nach oben steht und die Ferricyankaliumlösung in das Blut fließt (Abb. 23). Man schüttelt wieder 2 Minuten lang, hängt in das Wasserbad, mißt die Differenz, schüttelt wieder und verfährt genau wie oben beschrieben. Sobald sich der Meniskenunterschied nicht mehr ändert, wird abgelesen und in der oben beschriebenen Weise die Gasmenge festgestellt.

Beispiel: Manometerstand nach Eintritt des Temperaturgleichgewichtes:

	links		rechts
	120 mm		119,5 mm
	nach wiederholtem	Schütteln	(gleichbleibend)
	91 mm		118,5 mm
Änderung	29 mm		29,0 mm

gesamte Verschiebung also 58 mm.
Konstante k = 3,03 (für die untersuchte Flüssigkeitsmenge)
Volumen v = 58 · 3,03 = 176 cmm = 0,176 ccm.

Die Analyse mit dem Verzár- bzw. Migos-Apparat gibt direkt die Gasmenge durch Ablesung an der geeichten Pipette.

Wenn der Versuch bei 15 Grad und 755 mm ausgeführt wurde, ergibt die Reduktion auf 0 Grad und 760 mm

(nach Formel auf S. 165)

$$v_0 = 0{,}176 \cdot \frac{755}{760 \cdot 1{,}055} = 0{,}166 \text{ ccm.}$$

Dieses Volumen ist noch zu reduzieren, wenn die verwandten Pipetten auf einen anderen als den darauf angegebenen Gehalt geeicht wurden.

Das Verfahren dient zugleich zur Hämoglobinbestimmung im Blut; da 1 ccm Blut mit einem Hb-Gehalt von 17% (klinische Ausdrucksweise: 100%ig) 0,185 ccm Sauerstoff abgibt, kann man aus der Menge des abgegebenen O_2 den Hb-Gehalt des Blutes berechnen. In obigem Beispiel waren 0,166 ccm O_2 abgegeben. Aus der Gleichung 185 : 100 = 166 : x folgt ein Hb-Gehalt von 89,6% nach klinischer Ausdrucksweise oder von 15,2%.

b) Bestimmung der Differenz des Sauerstoffgehaltes im arteriellen und venösen Blut.

Für diese Bestimmung muß das Blut aus der Arterie und Vene so entnommen werden, daß es ohne Berührung mit der Luft unmittelbar in die Fläschchen des Apparates überführt werden kann. Hiezu wird es mit Spritzen, die für die betreffende Menge geeicht sind, direkt aus der Vene und Arterie[1]) entnommen: durch Einbringen einer kleinen Menge (2—3 mg) feinst gepulverten Kaliumoxalats in die Kanüle wird eine Gerinnung des aufgesaugten Blutes verhindert.

Man bringt in jede Flasche 2 ccm bzw. 0,2 ccm Ammoniaklösung, nachdem man dafür gesorgt hat, daß jede Spur von Ferricyankalium entfernt ist. Nachdem man die Kanüle außen gut abgewischt hat, schichtet man unter die Ammoniaklösung der einen Seite 1 bzw. 0,1 ccm arterielles Blut, auf der anderen Seite die gleiche Menge venöses Blut, indem man die Kanüle bis auf den Boden der Flasche führt. Nachdem man die Flaschen fest angesetzt hat, stellt man nach Eintritt des Temperaturgleichgewichtes die Stellung des Manometers fest, nimmt dann unter Beibehaltung der Kommunikation der Flaschen mit dem Manometer den Apparat aus dem Wasser heraus, schüttelt eine Minute lang, hängt in das Wasserbad ein, liest ab,

[1]) Beim Menschen gelingt dies am besten aus der A. radialis.

schüttelt wiederum, hängt nochmals ein und wiederholt die Ablesung, bis sie konstant geworden ist. Die gefundene Manometerdifferenz — unter Berücksichtigung einer etwaigen, vor dem Ausschütteln vorhandenen — multipliziert mit der Konstante k für das angewandte Volumen ergibt die Differenz zwischen Sauerstoffgehalt des arteriellen und venösen Blutes.

Die Methode mißt nicht den Sauerstoff des Hämoglobins, sondern den Unterschied des gesamten Sauerstoffs der beiden Proben. Ferner wird stillschweigend angenommen, daß arterielles und venöses Blut die gleiche Sauerstoffkapazität haben, was nicht immer der Fall ist.

c) Bestimmung der prozentualen Sauerstoffsättigung von Blut.

Diese wird nicht direkt ermittelt, sondern aus der zur vollständigen Sättigung fehlenden Menge. Ist A die Menge Sauerstoff, welche das Blut enthält, C die gesamte Sauerstoffkapazität und B die zur Sättigung fehlende Menge, so ist die prozentuale Sauerstoffsättigung gleich

$$100 \cdot \frac{A}{C}, \text{ oder, da } A = C - B \text{ ist, gleich } 100 \cdot \frac{C-B}{C}.$$

B wird bestimmt, indem die ganz trockenen und von jeder Spur von Ferricyankalium freien Flaschen mit 2 bzw. 0,2 ccm Ammoniaklösung gefüllt werden, 1 bzw. 0,1 ccm Blut, und zwar in die eine Flasche durch Schütteln mit Sauerstoff vollständig gesättigtes, in die andere Flasche unbehandeltes unterschichtet wird. Ferricyankalium wird jetzt nicht zugesetzt. Die Flaschen werden angesetzt, die Hähne geschlossen, nachdem im Wasserbad konstante Temperatur eingetreten ist, so daß die Manometerablesung unverändert bleibt. Darauf wird gründlich durchgeschüttelt, wobei die ungesättigte Blutprobe aus der Luft ihres Fläschchens Sauerstoff aufnimmt, und in üblicher Weise die Differenz des Manometerstandes bestimmt. Die Manometersäule steigt unter diesen Verhältnissen natürlich auf der Seite des anfangs ungesättigten Blutes.

Der Apparat wird dann aus dem Wasserbad herausgenommen und die Hähne zur Außenluft geöffnet, bei dem größeren Apparat — selbstverständlich nach ent-

sprechender Stellung der Flaschen, daß nichts hereinfließen kann — in die eine Kuppel 0,2 ccm, bei dem kleinen Apparat in die eine obere Mulde 1 Tropfen Ferricyankaliumlösung gegeben. In die zweite Flasche kommt die gleiche Menge Wasser. Nach Feststellung des Manometerstandes und Regulierung desselben durch wiederholtes Öffnen und Schließen der Hähne zur Außenluft wird die Verbindung des Manometers zum Flascheninhalt hergestellt, nach konstanter Einstellung durch Drehung der Flaschen die Ferricyankaliumlösung mit dem Blut gemischt, wie S. 170 angegeben, 2 Minuten stark geschüttelt, in das Wasserbad eingehängt, die Manometerdifferenz abgelesen und diese Prozedur so oft wiederholt, bis die beiden letzten Ablesungen miteinander übereinstimmen.

Berechnung: Da es sich um eine Differenzmethode handelt, kann jede Reduktion mit Hilfe der Konstanten sowie auf Barometerdruck und Temperatur unterbleiben. War bei der Differenzbestimmung von B die Manometerdifferenz b mm, bei der Bestimmung von C c mm, so berechnet sich die prozentuale Sättigung nach der oben angegebenen Formel einfach zu $100 \cdot \frac{c-b}{c}$ Prozent.

Beispiel: War die Manometerdifferenz bei der Bestimmung von B 19 mm, bei der von C 58 mm, so ergibt sich die prozentuale Sättigung zu $100 \cdot \frac{58-19}{58} = 67{,}2\%$.

Bestimmung des Kohlensäuregehaltes des Blutes.

Prinzip: Aus dem durch Ferricyankalium sauerstofffrei gemachten, hämolysierten Blut wird durch Weinsäure die Kohlensäure ausgetrieben.

Erforderliche Reagentien: 1. Ammoniaklösung (s. S. 170); 2. Ferricyankaliumlösung (s. ebenda); 3. Weinsäurelösung 20%, bei Anwendung der Verzár-Methode 50%.

Man gibt in die beiden Flaschen je 2 ccm bzw. 0,2 ccm Ammoniaklösung (CO_2-frei) und schichtet darunter vorsichtig auf der einen Seite 0,5 bzw. 0,1 defibriniertes Blut (s. oben), in das andere Fläschchen die gleiche Menge + 0,2 ccm bzw. + 0,05 ccm destilliertes, CO_2-frei gemachtes

Wasser (das Wasser ist vorher gut auszukochen und in einer mit einem Sicherheitsverschluß von Natronkalk versehenen Flasche aufzubewahren). Das Gefäß mit dem Blut wird gut umgeschüttelt, so daß es lackfarben wird (Krogh empfiehlt Zusatz von wenig Saponin zur Beförderung der Hämolyse); man achtet bei dem Fläschchen des kleinen Apparates darauf, daß die obere Mulde nicht benetzt wird. Man gibt zu dem mit Blut beschickten Fläschchen, nachdem die Hämolyse beendet ist, 0,2 ccm bzw. einen Tropfen Ferricyankaliumlösung und schüttelt bis zur vollständigen Austreibung des Sauerstoffs. Am großen Apparat setzt man nun die Flaschen nach Fettung der Schliffe an und hängt in das Wasserbad. Die Flaschen sind so zu drehen, daß das Kuppelrohr mit der Flasche nicht in Verbindung steht. Man gibt in das Kuppelrohr der Seite, welche das Blut enthält, 0,2 ccm einer 20%igen Weinsäurelösung, läßt, wenn die Temperatur des Wasserbades angenommen ist und die Manometerstellung sich nicht mehr ändert, die Verbindung des Manometers mit den Flaschen bestehen und durch Drehung der betreffenden Flasche die Weinsäure zum Blut fließen, schüttelt ungefähr 5 Minuten durch, hängt wieder in das Wasserbad, liest die Manometerdifferenz ab und wiederholt dies mit Ausschütteln und Einhängen, bis die Manometerablesung konstant geworden ist.

Bei dem kleinen Apparat wird ganz entsprechend verfahren: Man gibt in die obere Mulde des das Blut enthaltenden Fläschchens nach Austreibung des O_2 0,05 ccm Weinsäure, setzt an und läßt nach konstanter Einstellung des Manometerstandes im Wasserbad die Säurelösung zum Blute fließen. Durchschütteln und weitere Behandlung erfolgt ebenso wie im großen Apparat.

Beim Schütteln des Blutes mit Weinsäure bilden sich durch Koagulation leicht Klumpen; es ist daher auf schnelles, ausgiebiges Schütteln zu achten.

Benutzt man die Verzársche Trichterpipette (S. 168), so ist folgendes zu berücksichtigen: Man läßt in beide Birnen bei der Reaktion Weinsäure hereinfließen, um einen Fehler, der sich durch Carbonatgehalt der Saponin-

citratlösung einschleichen könnte, zu vermeiden. Hat man vorher festgestellt, daß diese Lösung absolut carbonatfrei ist, erübrigt sich diese Vorsichtsmaßregel.

Da die Saponincitratlösung alkalisch ist, ist zum Freisetzen des CO_2 eine stärkere Weinsäurekonzentration nötig: man verwendet eine 50%ige Lösung.

Die Berechnung erfolgt, wie für die O_2-Bestimmung angegeben, unter Anwendung der — für das Volumen geltenden — Konstanten, bei Verwendung des Verzár- und Migos-Apparates nach einfacher Ablesung und Reduktion auf 760 cm und 0 Grad.

Bestimmungen mit der van Slykeschen Apparatur.

Der von van Slyke angegebene Apparat (Abb. 29, S. 177) ist folgendermaßen konstruiert. Der große Pipettenraum G setzt sich nach obenhin in einen stark verengten Teil und weiterhin in einen fast kapillaren Teil fort. Der Gesamtraum von einer am unteren Teil des Pipettenraumes angebrachten Marke bis zum obersten Ende umfaßt 50 ccm. Von diesen entfällt auf den kapillaren Teil 1 ccm, der in 50 Teile zu je 0,02 ccm geteilt ist, so daß 0,01 ccm abgelesen werden kann. Der darunter liegende Teil hat Marken in größeren Abständen, die letzte (2,5 ccm) am Ausgang des Mittelteiles. Das obere Ende des genau geteilten Meßrohres kommuniziert durch einen doppelt durchbohrten Hahn entweder mit einem kapillaren, zur Außenluft führenden Rohr a oder mit einem Aufsatz b, der ebenfalls seine Verbindung durch ein Kapillarrohr erhält. Der untere Teil des Pipettenraumes kommuniziert durch einen Hahn f entweder mit einem kleineren Vorratsraum d, oder mit einem Rohr c; c und d vereinigen sich an ihrem unteren Ende zu einem Ansatzstück. Von diesem führt ein dickwandiger Schlauch von etwas größerer Länge, als die Höhe des gesamten Apparates beträgt (Druckschlauch), zum Reservoir H.

Der ganze Apparat muß aus starkem Glas angefertigt sein: er wird in einem festen Stativ eingeklammert.

Um den Hals von H wird ein starker Draht mit Schlinge befestigt, mit der man dieses Gefäß in verschiedenen Höhen fixieren kann. Die Schliffe müssen tadellos funktionieren, so daß nur eine geringe Spur Fett notwendig ist, um einen absolut luftdichten Verschluß herzustellen. Infolge des starken Druckes durch die Quecksilberfüllung müssen die Hähne durch Gummibänder, oder besser noch durch Drahtspiralen so fixiert sein, daß sie bei einer Druckerhöhung nicht herausgeschleudert werden können.

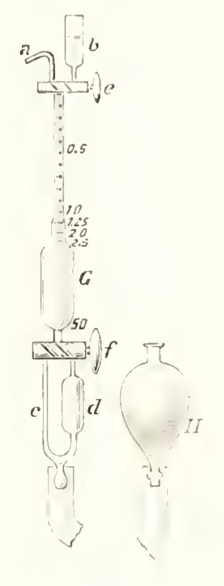


Abb. 29.

Neuerdings sind Anordnungen angegeben (und im Handel), bei welchen der ganze Glasapparat in einem mit Wasser gefüllten Behälter eingeschlossen ist, was die spätere Berechnung sicherer macht. Bei konstanten Temperaturverhältnissen im Versuchsraum (ca. 1 Grad Differenz) sind sie entbehrlich.

Bestimmung der Alkalireserve des Blutes nach van Slyke.

Prinzip: Aus dem mit 5,5%iger CO_2 im Gleichgewicht befindlichen Plasma wird die gesamte Kohlensäure durch Schwefelsäure in Freiheit gesetzt; aus dem erhaltenen, am Apparat abgelesenen Volumen wird der Wert berechnet oder aus einer Tabelle abgelesen.

Notwendige Lösungen: 1. 1%ige, CO_2-freie Ammoniaklösung: um eine absolut kohlensäurefreie Lösung zu gewinnen, wird die Ammoniaklösung mit Bariumhydrat versetzt, vom ausgefallenen Carbonat abfiltriert und ein eventueller Überschuß an Barium mit Ammonsulfat ausgefällt. 2. Schwefelsäure, 10%ig, 3. Oktylalkohol, sekundär 1 (Kahlbaum); wenn nicht beschaffbar, gewöhnlicher Caprylalkohol.

Die Bestimmung der Gesamtkohlensäure des Plasmas hat zur Voraussetzung, daß das Plasma bei der Unter-

suchung im Gleichgewicht mit dem CO_2-Gehalt der Alveolarluft ist. Schon bei kurzem Aussetzen an Luft dunstet CO_2 ab. Man muß also entweder das Blut unter Paraffin auffangen, was immerhin kompliziert ist, oder — einfach — das Plasma künstlich mit Kohlensäure sättigen. Man verfährt hiezu folgendermaßen.

Man läßt das Blut direkt aus der Vene in ein graduiertes Zentrifugenglas einlaufen, welches 0,5% der zu entnehmenden Blutmenge an feingepulvertem Kaliumoxalat enthält. Will man also 10 ccm Blut entnehmen, bringt man vorher in das Zentrifugenglas 0,05 g fein gepulvertes Kaliumoxalat und läßt das Blut direkt aus der Nadel unter leichtem Bewegen des Glases in dieses hereinlaufen. Am Ende schüttelt man einige Male vorsichtig um. Die Vene darf nicht zu sehr gestaut sein. Am besten ist, überhaupt ohne jegliche Stauung zu entnehmen: war eine solche nicht zu umgehen, so ist sie sofort nach dem Einstechen der Nadel zu entfernen. Mindestens eine Stunde vor Entnahme ist, wenn man normale Verhältnisse haben will, stärkere Muskeltätigkeit zu vermeiden.

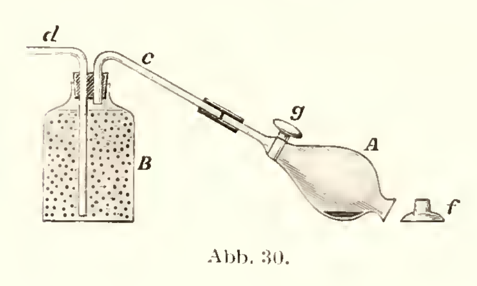


Abb. 30.

Das Blut wird in üblicher Weise zentrifugiert, das Plasma abgehoben und kurz vor dem Versuch in folgender Weise mit Kohlensäure gesättigt. Man stellt sich eine kleine Apparatur in Form der Abb. 30 her. In dieser ist A ein Scheidetrichter, der bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung, bei der man ungefähr 3 ccm Plasma verarbeitet, ca. 300 ccm Inhalt hat. Mit seinem unteren Ende durch einen Schlauch verbunden ist eine mit einem Gummistopfen verschlossene Flasche B; durch die eine Bohrung des Stopfens geht das Verbindungsrohr c zum Scheidetrichter, das dicht unter dem Stopfen endet, durch die andere Bohrung das Rohr d, welches bis fast auf den Boden der Flasche reicht. Die Flasche B ist mit Glas-

perlen gefüllt. Man bringt in den Scheidetrichter ca. 3 ccm Plasma und atmet nun durch das Rohr nach gewöhnlicher Einatmung tief aus. Beim Durchgang durch B schlägt sich die Feuchtigkeit, die sonst Fehler erzeugen könnte, auf den Glaskugeln nieder; durch c entweicht die kohlensäurehaltige Luft in den Scheidetrichter A und verdrängt dort die darin enthaltene Luft. Unmittelbar nach der Ausatmung setzt man den Stöpsel f auf den Scheidetrichter auf und schließt ihn auch nach der anderen Seite durch den Hahn g ab. Man entfernt den Scheidetrichter vom Schlauche und sättigt durch langsames Drehen das Plasma vollständig mit der CO_2-haltigen Alveolarluft. Genauer ist es, statt der Ausatmungsluft eine 5,5% CO_2 enthaltende Luftmischung anzuwenden, die man aus einer Gasflasche durch den Apparat schickt[1]). Vor Beginn der Versuche muß der Apparat (Abb. 29) mit reinem Quecksilber gefüllt werden, und zwar muß die Menge des Quecksilbers so groß sein, daß der ganze Apparat mit der Schlauchverbindung und dem unteren Drittel von H gefüllt ist. Bei neu in Benutzung kommenden Apparaten ist außerdem eine Kalibrierung erforderlich, indem man einen bestimmten Teil des graduierten Rohres mit destilliertem Wasser füllt und nach Herausdrücken des Wassers durch das Kapillarrohr a mit der Waage feststellt, ob das Gewicht dem angegebenen Volumen entspricht. Zur Prüfung auf Dichtheit stellt man den Hahn e so, daß der Apparat mit der äußeren Luft durch b kommuniziert, und den Hahn f ebenfalls auf Kommunikation von G mit dem unteren Teil. Man hebt nun H, das man zu ungefähr $^3/_4$ mit Quecksilber gefüllt hat, so weit, daß der ganze Apparat mit Quecksilber gefüllt ist und noch ein geringer Teil über dem Hahn e steht. Dann schließt man durch Drehung von e das graduierte Rohr vollständig von der Außenluft ab und senkt H so tief, wie der Schlauch reicht. Bei Wiedererhebung zum früheren Niveau muß sich die infolge des Senkens von H fallende Quecksilbersäule unter leichtem Anschlagen wieder bis zum Hahne einstellen.

---

[1]) Der CO_2-Gehalt der Ausatmungsluft schwankt zwischen 4 und 5,5%. Für die klinische Bewertung spielt das keine Rolle.

Zum Beginn jedes Versuches geht man von dem vollständig mit Quecksilber gefüllten Apparat aus, wobei der Hahn e so stehen muß, daß eine Kommunikation des graduierten Rohres mit dem Ansatzstück b hergestellt ist und durch entsprechende Stellung des Niveaugefäßes H das Quecksilber die Kapillare am unteren Ende von b ganz füllt.

Durch Einfüllen von Ammoniaklösung in das Teil b entfernt man aus diesem sämtliche Säurespuren. Man pipettiert das Ammoniak wieder heraus bis auf einen kleinen Rest und unterschichtet diesen mit einer Pipette mit 1 ccm des vorbereiteten Plasmas. Bei gleicher Hahnstellung senkt man das Niveaugefäß H so tief, daß das Plasma in das gradnierte Rohr hereingezogen wird. Sobald der größte Teil des Plasmas den Hahn e passiert hat, ohne daß jedoch Luft angesaugt worden ist, wird dieser geschlossen, so daß das Rohr keinerlei Verbindung mehr mit der Außenluft hat. Man gibt dann in b zunächst ca. 0,1 ccm destilliertes Wasser, läßt diese unter Senkung von H durch Öffnung von e zum Plasma fließen, indem man ebenfalls darauf achtet, daß noch etwas Flüssigkeit in b bleibt, wiederholt diese Manipulation mit weiteren 0,5 ccm destilliertem Wasser, das ungefähr ¼ Tropfen Oktylalkohol enthält und gibt endlich unter gleicher Vorsichtsmaßregel 0,5 ccm 10%ige Schwefelsäure dazu. Die Flüssigkeit muß genau den Raum vom oberen Ende des kalibrierten Rohres bis zur Marke 2,5 einnehmen, widrigenfalls ist etwas Wasser nachzusaugen. Man schließt nun durch Drehung des Hahnes e den graduierten Teil vollständig gegen außen ab und führt das Niveaugefäß H ganz tief, wodurch infolge Ausbildung eines Vakuums die Flüssigkeit in den Raum G hereingesaugt wird und das Quecksilber nur bis zum Hahn f steht. Man schließt nun auch den Hahn f, so daß die ganze Flüssigkeit in dem Raum zwischen den Hähnen e und f eingeschlossen ist. Durch ungefähr 15maliges Umdrehen[1])

---

[1]) Eine neue Konstruktion erlaubt dieses Umschütteln ohne Herausnehmen des Apparates aus dem Stativ.

des aus dem Stativ herausgenommenen Apparates wird die gesamte Kohlensäure frei gemacht. Man befestigt wieder am Stativ, stellt durch Drehen von f die Kommunikation von G und d her und läßt durch Senken von H die Flüssigkeit aus G nach d fließen, wobei man darauf achten muß, daß kein Gas mit herausgeht; es muß also eine ganz geringe Menge Flüssigkeit im untersten Teile von G bleiben. Nunmehr dreht man f so, daß c mit G kommuniziert und hebt H so weit, bis sein Niveau dem sich einstellenden Quecksilberniveau im graduierten Rohr entspricht. Unter diesen Bedingungen ergibt die Ablesung am graduierten Rohr (bei der der kleine über dem Quecksilber stehende Wasserrest wie Quecksilber zu rechnen ist) die Menge der entwickelten Kohlensäure. Da man, wie oben erwähnt, 3 ccm Plasma mit CO_2 gestättigt hat, hat man genügend Material, um sofort einen Kontrollversuch anzuschließen.

Die Berechnung der CO_2-Kapazität (Alkalireserve) des Plasmas erfolgt nach van Slyke in genügender Annäherung nach der Formel

$$x = \frac{B}{760} \cdot (100,8 - 0,27\ t)\ (V - 0,136 + 0,002\ t).$$

In dieser Formel bedeutet x die auf 0 und 760 ccm reduzierten ccm CO_2, die 1 ccm Plasma, das bei 20^0 im Gleichgewicht mit Alveolarluft, bzw. einer $5,5^0/_0$igen CO_2-Lösung ist, als Bicarbonat bindet. B ist der abgelesene Barometerdruck, t die Temperatur (Centigrade), V die am Apparat abgelesene CO_2-Menge in ccm.

Um die Rechnung zu vereinfachen, haben van Slyke und Cullen beifolgende Tabelle (S. 182) aufgestellt, aus der man für Temperaturen zwischen 15^0 und 30^0 sofort die „Alkalireserve“ für 100 ccm Plasma ablesen kann, wenn man das Produkt $V \cdot \frac{B}{760}$ $\left(\text{Ablesung in ccm} \cdot \frac{\text{Barometerstand zur Zeit des Versuches (mm)}}{760}\right)$ ausgerechnet hat. Fur Zwischentemperaturen muß natürlich interpoliert werden.

$V \cdot \frac{B}{760}$	100 ccm Plasma binden als Bicarbonat ccm CO_2 (0° und 760 mm)				$V \cdot \frac{B}{760}$	100 ccm Plasma binden als Bicarbonat ccm CO_2 (0° und 760 mm)			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,20	9,1	9,9	10,7	11,8	0,60	47,7	48,1	48,5	48,6
0,21	10,1	10,9	11,7	12,6	0,61	48,7	49,0	49,4	49,5
0,22	11,0	11,8	12,6	13,5	0,62	49,7	50,0	50,4	50,4
0,23	12,0	12,8	13,6	14,3	0,63	50,7	51,0	51,3	51,4
0,24	13,0	13,7	14,5	15,2	0,64	51,6	51,9	52,2	52,3
0,25	13,9	14,7	15,5	16,1	0,65	52,6	52,8	53,2	53,2
0,26	14,9	15,7	16,4	17,0	0,66	53,6	53,8	54,1	54,1
0,27	15,9	16,6	17,4	18,0	0,67	54,5	54,8	55,1	55,1
0,28	16,8	17,6	18,3	18,9	0,68	55,5	55,7	56,0	56,0
0,29	17,8	18,5	19,2	19,8	0,69	56,5	56,7	57,0	56,9
0,30	18,8	19,5	20,2	20,8	0,70	57,4	57,6	57,9	57,9
0,31	19,7	20,4	21,1	21,7	0,71	58,4	58,6	58,9	58,8
0,32	20,7	21,4	22,1	22,6	0,72	59,4	59,5	59,8	59,7
0,33	21,7	22,3	23,0	23,5	0,73	60,3	60,5	60,7	60,6
0,34	22,6	23,3	24,0	24,5	0,74	61,3	61,4	61,7	61,6
0,35	23,6	24,2	24,9	25,4	0,75	62,3	62,4	62,6	62,5
0,36	24,6	25,2	25,8	26,3	0,76	63,2	63,3	63,6	63,4
0,37	25,5	26,2	26,8	27,3	0,77	64,2	64,3	64,5	64,3
0,38	26,5	27,1	27,7	28,2	0,78	65,2	65,3	65,5	65,3
0,39	27,5	28,1	28,7	29,1	0,79	66,1	66,2	66,4	66,2
0,40	28,4	29,0	29,6	30,0	0,80	67,1	67,2	67,3	67,1
0,41	29,4	30,0	30,5	31,0	0,81	68,1	68,1	68,3	68,0
0,42	30,3	30,9	31,5	31,9	0,82	69,0	69,1	69,2	69,0
0,43	31,3	31,9	32,4	32,8	0,83	70,0	70,0	70,2	69,9
0,44	32,3	32,8	33,4	33,8	0,84	71,0	71,0	71,1	70,8
0,45	33,2	33,8	34,3	34,7	0,85	71,9	72,0	72,4	71,8
0,46	34,2	34,7	35,3	35,6	0,86	72,9	72,9	73,0	72,7
0,47	35,2	35,7	36,2	36,5	0,87	73,9	73,9	74,0	73,6
0,48	36,1	36,6	37,2	37,4	0,88	74,8	74,8	74,9	74,5
0,49	37,1	37,6	38,1	38,4	0,89	75,8	75,8	75,8	75,4
0,50	38,1	38,5	39,0	39,3	0,90	76,8	76,7	76,8	76,4
0,51	39,1	39,5	40,0	40,3	0,91	77,8	77,7	77,7	77,3
0,52	40,0	40,4	40,9	41,2	0,92	78,7	78,6	78,7	78,2
0,53	41,0	41,4	41,9	42,1	0,93	79,7	79,6	79,6	79,2
0,54	42,0	42,4	42,8	43,0	0,94	80,7	80,5	80,6	80,1
0,55	42,9	43,3	43,8	43,9	0,95	81,6	81,5	81,5	81,0
0,56	43,9	44,3	44,7	44,9	0,96	82,6	82,5	82,4	82,0
0,57	44,9	45,3	45,7	45,8	0,97	83,6	83,4	83,4	82,9
0,58	45,8	46,2	46,6	46,7	0,98	84,5	84,4	84,3	83,8
0,59	46,8	47,1	47,5	47,6	0,99	85,5	85,3	85,2	84,8
0,60	47,7	48,1	48,5	48,6	1,00	86,5	86,2	86,2	85,7

Van Slyke und Cullen, Journ. of biol. Chem. 30, 316.

Die aus der Tabelle abgelesenen (korrigierten) Werte liegen bei normalen Erwachsenen zwischen 77 und 53 (bei Kindern zwischen 63 und 46), bei mäßiger Acidose zwischen 40 und 30, bei starker Acidose unter 30.

Bestimmung des Sauerstoffes und des Kohlenoxyds[1].

Prinzip: Der Sauerstoff und mit ihm das — wenn vorhandene — Kohlenoxyd wird durch Zugabe von Ferricyankalium in Freiheit gesetzt und das Volumen das Gases abgelesen. Aus der entwickelten Gasmenge wird durch alkalische Pyrogallollösung der Sauerstoff absorbiert und das Volumen des zurückbleibenden Kohlenoxyds bestimmt. Notwendige Lösungen: 1. Ammoniaklösung: 6 ccm 25%iger Ammoniaklösung auf 1 l aufgefüllt; 2. Ferricyankaliumlösung, gesättigt. Zur Entfernung vorhandenen Sauerstoffs ist die Lösung aufzukochen; 3. alkalische Pyrogallollösung. 10 g Pyrogallol werden in 200 ccm einer Lösung von 160 g Kaliumhydrat in 130 ccm Wasser aufgelöst; 4. Capryl- oder Oktylalkohol; 5. Saponin in Substanz.

Der Apparat wird zunächst, wie bei der Bestimmung der Kohlensäure beschrieben, auf Dichtigkeit geprüft. Um die Ammoniaklösung von etwaigem Gehalt an Sauerstoff zu befreien, wird, nachdem das Quecksilber ein wenig durch den Hahn e in den Aufsatz b hereingedrückt ist, ungefähr 6 ccm Ammoniaklösung mit 5 Tropfen Caprylalkohol und eine Messerspitze Saponin in den Aufsatz hereingetan, durch Öffnen des Hahnes e und Senken des Reservoirs der größte Teil der Lösung in den Apparat hereingezogen und nach Schließen des Hahnes e die hereingezogene Lösung durch Herstellung eines Vakuums (wie bei der Kohlensäurebestimmung) evakuiert. Man läßt dann ebenfalls das Quecksilber wieder hochgehen, läßt die überflüssige Luft heraus und wiederholt mit der gleichen Lösung nochmals die Evakuierung. Man läßt nun durch Hahn a die sauerstofffrei gemachte Ammoniaklösung heraus.

Bei der Ausgangsstellung für den Versuch, d. h. Verbindung des Mittelteils mit Aufsatz b und Stellung des

[1]) Nach van Slyke.

Quecksilbers so, daß es etwas in den Teil b hereinragt, bringt man 2 ccm der evakuierten Ammoniaklösung in den Oberteil b und schichtet mit einer Pipette 2 ccm Blut unter die Lösung. Das Blut war vorher defribriniert und durch Schütteln an der Luft mit Sauerstoff gesättigt. Man zieht nun die Mischung fast vollständig in den Apparat herein, gibt einige Tropfen der Ammoniaklösung nach und zieht diese auch in den Apparat. Darauf gibt man in gleicher Weise 0,4 ccm der gesättigten, durch Aufkochen luftfrei gemachten Ferricyankaliumlösung nach, gibt ebenfalls noch etwas Wasser in den Aufsatz und zieht dieses nach, so daß noch etwas Flüssigkeit über dem Hahn e steht[1]). Man schließt diesen Hahn, wenn es noch nicht geschehen war, und macht nun die Analyse in gleicher Weise, wie es für die Bestimmung der Kohlensäure beschrieben worden ist.

Die Ablesung des Gasvolumens kann auch vorgenommen werden, ohne daß das Wasser beseitigt wird. Man kann, indem man die Flüssigkeit den gleichen Weg wieder hochsteigen läßt, die Ablesung direkt vornehmen, wenn man das spezifische Gewicht der Wassersäule berücksichtigt. Da das spezifische Gewicht des Quecksilbers 14mal höher ist als das des Wassers, muß man den Quecksilberspiegel im Reservoir so einstellen, daß er etwas höher steht als der Quecksilberspiegel im Rohre, und zwar um $^1/_{14}$ der Höhe der Wassersäule. Die Ablesung erfolgt nach dieser Einstellung am Meniskus der Wassersäule.

Zur Bestimmung des Kohlenoxyds wird der Sauerstoff aus dem mit Ferricyankalium freigesetzten Gasgemisch durch Pyrogallol absorbiert. Hierzu gibt man bei geschlossenem Hahn e in den Aufsatz 3 ccm der Pyrogallollösung, öffnet nun den Hahn e und zieht durch Senken des Reservoirs vorsichtig die Flüssigkeit bis auf einen überstehenden Rest in den Mittelteil herein. Man schließt den Hahn e, evakuiert wieder in bekannter Weise, und schüttelt im Vakuum 1 Minute gut durch. Man läßt jetzt das übrigbleibende Gas in üblicher Weise wieder nach oben

[1]) Zur besseren Abdichtung gibt man einen Tropfen Quecksilber herauf.

steigen, gibt wieder etwas Pyrogallollösung in den Aufsatz, zieht wieder vorsichtig ein und evakuiert nach Schließen des Hahnes e nochmals. Man läßt dann wieder bis oben steigen und liest unter Berücksichtigung des spefizischen Gewichtes von Flüssigkeit und Quecksilber das Volumen des Kohlenoxyds ab. Ist die Ablesung infolge der starken Dunkelfärbung der Pyrogallollösung nicht möglich, so kann man durch Einbringen von etwas wäßriger Oktylalkohollösung, die man unter den wiederholt genannten Vorsichtsmaßregeln einfließen läßt, einen neuen Meniskus entstehen lassen.

Das abgelesene Volumen für Sauerstoff wird in bekannter Weise auf 760 mm und 0 Grad reduziert, aus dem abgelesenen CO-Volumen wird der wahre CO-Gehalt berechnet nach der Formel $x = v \cdot (0{,}999 - 0{,}0016\,t)\,\frac{p}{760}$.

Anhang.

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration (des Wasserstoffexponenten — p_H —) durch Indikatoren.

Verfahren nach L. Michaelis.

Diese Methode gehört, streng genommen, nicht eigentlich in das hier behandelte Gebiet; immerhin mag sie als Ergänzung manchem angenehm sein, besonders da sie, obgleich auf strengster theoretischer Basis aufgebaut, ohne Vorkenntnisse schnell und sicher auszuführen ist. Sie ist geeignet für Harn und andere physiologische Flüssigkeiten, auch für Nährflüssigkeiten usw.

Prinzip: Auf Grund elektrometrischer Messung werden mit mehreren Indikatoren, mit einem Umschlag von farblos nach gefärbt, Reihen hergestellt, deren Färbung mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration intensiver wird. Die so hergestellten Färbungen dienen als Testobjekte gegenüber der in der zu untersuchenden Flüssigkeit mit

Hilfe des gleichen Indikators hergestellten Färbung. Wird eine schon an sich gefärbte Lösung untersucht, so wird als Vergleichsobjekt die Färbung einer Lösung bekannter Wasserstoffionenkonzentration + Eigenfärbung der untersuchten Flüssigkeit genommen.

Notwendige Reagentien: 1. 0,033%ige wäßrige Lösung von β-Dinitrophenol; 2. 0,05%ige wäßrige Lösung von α(1,2,4)-Dinitrophenol; 3. 0,025%ige wäßrige Lösung von γ-Dinitrophenol; 4. 0,1%ige wäßrige Lösung von p-Nitrophenol; 5. 0,3%ige wäßrige Lösung von m-Nitrophenol; 6. $^1/_{10}$ Normal-Natriumcarbonatlösung; 7. Kochsalzlösung 0,85%ig; 8. Kochsalzlösung 2%ig.

Zur Herstellung der Testlösungen werden Reagensgläser gleicher Weite — man prüft dies, indem man in jedes Röhrchen die gleiche Menge Wasser, z. B. 10 ccm gibt, das dann gleich hoch stehen muß — ausgesucht und mit jedem Indikator 8—9 Mischungen verschiedener Intensität entsprechend den verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen auf folgende Weise hergestellt. Für Reihe 1 werden 5 ccm der β-Dinitrophenollösung mit $^1/_{10}$ Normal-Sodalösung auf 50 ccm verdünnt, für die anderen Reihen werden von den Indikatorlösungen 2—5 ebenfalls mit Sodalösung die gleichen Verdünnungen hergestellt. Die Mischung dieser Lösungen mit $^1/_{10}$ Normal-Sodalösung in verschiedenen Verhältnissen ergibt die erforderlichen Vergleichslösungen. Die Abmessungen sind sehr genau vorzunehmen. Es ergeben sich dann folgende Reihen:

Reihe I

Nr.	p_H	Verd. β-Dinitrophenollösung	n/10 Sodalösung
1.	2,4	0,49 ccm	6,51 ccm
2.	2,6	0,76 ,,	6,24 ,,
3.	2,8	1,15 ,,	5,85 ,,
4.	3,0	1,68 ,,	5,32 ,,
5.	3,2	2,44 ,,	4,56 ,,

	Reihe II			Reihe III		
Nr.	p_H	Verd. α-Dinitrophenollösung	n/10 Sodalösung	p_H	Verd. γ-Dinitrophenollösung	n/10 Sodalösung
1.	2,8	0,51 ccm	6,49 ccm	4,0	0,74 ccm	6,26 ccm
2.	3,0	0,78 ,,	6,22 ,,	4,2	1,10 ,,	5,90 ,,
3.	3,2	1,20 ,,	5,80 ,,	4,4	1,65 ,,	5,35 ,,
4.	3,4	1,74 ,,	5,26 ,,	4,6	2,40 ,,	4,60 ,,
5.	3,6	2,50 ,,	4,50 ,,	4,8	3,40 ,,	3,60 ,,
6.	3,8	3,40 ,,	3,60 ,,	5,0	4,50 ,,	2,50 ,,
7.	4,0	4,60 ,,	2,40 ,,	5,2	5,50 ,,	1,50 ,,
8.	4,2	5,70 ,,	1,30 ,,	5,4	6,60 ,,	0,40 ,,
9.	4,4	6,70 ,,	0,30 ,,			

	Reihe IV			Reihe V		
Nr.	p_H	Verd. p-Nitrophenollösung	n/10 Sodalösung	p_H	Verd. m-Nitrophenollösung	n/10 Sodalösung
1.	5,4	0,16 ccm	6,84 ccm	6,8	0,27 ccm	6,73 ccm
2.	5,6	0,25 ,,	6,75 ,,	7,0	0,43 ,,	6,57 ,,
3.	5,8	0,40 ,,	6,60 ,,	7,2	0,66 ,,	6,34 ,,
4.	6,0	0,63 ,,	6,37 ,,	7,4	1,0 ,,	6,0 ,,
5.	6,2	0,94 ,,	6,06 ,,	7,6	1,5 ,,	5,5 ,,
6.	6,4	1,4 ,,	5,6 ,,	7,8	2,3 ,,	4,7 ,,
7.	6,6	2,08 ,,	4,92 ,,	8,0	3,0 ,,	4,0 ,,
8.	6,8	3,0 ,,	4,0 ,,	8,2	4,2 ,,	2,8 ,,
9.	7,0	4,05 ,,	2,95 ,,	8,4	5,2 ,,	1,8 ,,

Die gefüllten Reagensgläser werden etikettiert: auf das Etikett wird die Reihe und die Nummer sowie der p_H notiert. Sie werden mit paraffinierten Korken luftdicht verschlossen oder zugeschmolzen und halten sich, wenn außer Gebrauch vor Licht geschützt, lange Zeit unverändert[1].

[1] Fertige Reihen mit allem Zubehör (Indikatoren, Komparator usw.) sind im Handel erhältlich.

Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration einer farblosen Lösung wird folgendermaßen verfahren: Man versetzt in einem Reagensglase gleichen Kalibers wie die Testproben 6 ccm der Flüssigkeit mit 1 ccm der Stammlösungen der verschiedenen Indikatoren. Geben mehrere Indikatoren eine Färbung, so wird für den kolorimetrischen Vergleich der letzte, eine Färbung gebende Indikator verwendet: wird also z. B. mit Indikator 1, 2, 3 eine Färbung hervorgebracht, so dient die Färbung mit 3 zum Vergleich. Man sucht nun einfach aus der mit demselben Indikator hergestellten Reihe das farbähnlichste Teströhrchen heraus. Entspricht dieses genau der mit der Versuchslösung erhaltenen Färbung, so kann man von dem Etikett direkt den p_H ablesen: liegt die Färbung zwischen zwei Teströhrchen, so interpoliert man.

Ist die Lösung, deren p_H man feststellen will, gefärbt, so wird der Walpolesche Komparator (nach Angabe von Michaelis) angewandt. Dieser (Abb. 31) besteht aus einem massiven Holzblock, in den von oben 6 Löcher in zwei genau entsprechenden Reihen hereingebohrt sind, in deren jedes ein Reagensglas bis zu ungefähr zwei Drittel herein gesteckt werden kann. Von vorn nach hinten sind 3 Löcher durchgebohrt, deren jedes zwei hintereinander stehende Löcher durchsetzt. Auf der Rückseite ist eine Mattscheibe angebracht: außerdem kann eine Blauscheibe vorgesetzt werden. Will man

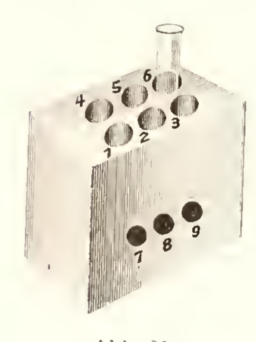


Abb. 31.

z. B. Harn auf seinen p_H untersuchen, so verfährt man folgendermaßen. In ein Reagensglas gleichen Kalibers wie die Teströhrchen bringt man 2 ccm Harn, 1 ccm 2%ige Kochsalzlösung — der p_H einer Lösung wird durch solche Verdünnung nicht verändert — und 1 ccm Indikator. Man steckt dieses Glas in die Bohrung 2 und in die dahinterliegende Bohrung 5 ein gleiches Reagensglas mit Wasser. In die Bohrung 3 bringt man ein Reagensglas mit 2 ccm des gleichen Harnes + 5 ccm 2%ige Kochsalzlösung. In Bohrung 6 steckt

man der Reihe nach die mit dem gleichen Indikator hergestellten Testlösungen und beobachtet durch die Sehlöcher 8 und 9, bei Einbringen welchen Röhrchens in Bohrung 6 die Farbtiefe in den beiden Guckköchern gleich wird. Man hält dazu den Komparator am besten gegen Tageslicht, zunächst mit der Mattscheibe; sehr zweckmäßig ist die von Michaelis empfohlene Hinterschaltung der Blauscheibe, wodurch die Quantitätsunterschiede der Farben in Qualitätsunterschiede verwandelt werden, die man bedeutend genauer ablesen kann. Ist nach Einbringen eines Röhrchens in 6 genau gleiche Farbtiefe erreicht, so gibt der auf diesem Teströhrchen notierte p_H direkt den p_H der untersuchten Lösung an. Unter Umständen muß auch hier interpoliert werden. Für Nährbouillon verfährt man in ganz gleicher Weise, nur daß man als Verdünnung 0,85%ige Kochsalzlösung verwendet.

Sind die Lösungen sehr stark gefärbt oder getrübt, so nimmt man für die Versuchslösung (in Bohrung 2) 1 ccm Harn usw., 5 ccm Kochsalzlösung, 1 ccm Indikator; für die Lösung in Bohrung 3 1 ccm Harn usw. + 6 ccm Kochsalzlösung. Die Ablesung und das sonstige Verfahren bleiben unverändert.

Modifikation von Hämäläinen, Leikola, Airila[1]).

Da die nach Michaelis hergestellten Indikatordauerreihen mit den verschiedenen Indikatoren sehr ähnliche Farbtöne geben, haben Verfasser eine einzige Reihe hergestellt, welche zum Vergleich der mit den verschiedenen Indikatoren erzeugten Färbungen dienen kann. Diese wird folgendermaßen hergestellt: 10 ccm wäßrige 0,05%ige Lösung von α-Dinitrophenol werden (genau wie auch Michaelis angibt) mit n/10 Natriumcarbonatlösung auf 100 ccm verdünnt. Diese (B) dient zur Herstellung der Röhrchen I—IX. Für X und XI wird nur unverdünnte, 0,05%ige α-Dinitrophenollösung (A) benutzt. Der Ansatz der verschiedenen Röhrchen ist der folgende:

---

[1]) Skandinav. Archiv für Physiologie 1923, Bd. 13, S. 241.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Dinitrophenollösung, verdünnt (B)	0,51	0,78	1,20	1,74	2,50	3,40	4,60	5,70	6,70		
Dinitrophenollösung, unverdünnt (A)										0,77	0,85
n/10 Natriumcarbonatlösung	6,49	6,22	5,80	5,26	4,50	3,60	2,40	1,30	0,30	6,23	6,15

Die Reagensgläser werden entweder mit paraffinierten Korken verschlossen oder noch besser zugeschmolzen.

Zur Bestimmung des p_H verfährt man genau wie vorher bei der Methode von Michaelis angegeben. Die Indikatorlösungen sind die gleichen, auch der Vergleich im Komparator erfolgt genau in gleicher Weise, nur mit dem Unterschied, daß eben die eine Reihe für alle Indikatorgebiete benutzt wird. Je nachdem, welcher Indikator zur Erzielung der Färbung in der zu untersuchenden Lösung benutzt worden ist, ergeben sich bei Farbengleichheit mit einem der Standardröhrchen folgende p_H-Werte.

Nr.	α-Dinitrophenol	γ-Dinitrophenol	p-Nitrophenol	m-Nitrophenol
I	2,8		5,2	6,8
II	3,0		5,4	7,0
III	3,2		5,6	7,2
IV	3,4		5,75	7,35
V	3,6		5,9	7,45
VI	3,8	5,0	6,05	7,6
VII	4,0		6,2	7,7
VIII	4,2		6,35	7,75
IX	4,4		6,5	7,8
X	4,6		6,6	7,9
XI	4,8		6,7	8,0

Das Reihenkolorimeter Migos[1]) erlaubt auf Grund dieser Tatsachen die Feststellung des p_H in besonders einfacher Weise.

[1]) Hersteller: Artur Goldberg, Prag.

Sachregister.


WELLCO
LIB







